

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIA  
Departamento de Nutrición, Bromatología  
y Tecnología de los Alimentos



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación *In vitro* e *in vivo* de la seguridad de nanopartículas de plata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Alicia Ávalos Fúnez**

Directoras

**Paloma Morales Gómez  
Ana Isabel Haza Duaso**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA  
DE LOS ALIMENTOS**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*  
DE LA SEGURIDAD DE  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA**



**TESIS DOCTORAL**

**ALICIA ÁVALOS FÚNEZ**

**DIRECTORAS**

**PALOMA MORALES GÓMEZ**

**ANA ISABEL HAZA DUASO**

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA SEGURIDAD DE  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

**TESIS DOCTORAL**

**ALICIA ÁVALOS FÚNEZ**

**DIRECTORAS:**

**PALOMA MORALES GÓMEZ  
ANA ISABEL HAZA DUASO**

**Madrid, 2017**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA SEGURIDAD DE  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención  
honorífica de “Doctorado Europeo”, presenta la  
Licenciada Alicia Ávalos Fúnez

Madrid, 2017





Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.  
Facultad de Veterinaria.  
Universidad Complutense

---

Avenida Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid  
Teléfono: 91 394 37 47. Fax: 91 394 37 43

**PALOMA MORALES GÓMEZ Y ANA ISABEL HAZA DUASO (Profesoras titulares) DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada: “Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la seguridad de nanopartículas de plata” de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. Alicia Ávalos Fúnez, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de las que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la UCM con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, a 22 de marzo de 2017.

Las Directoras de la Tesis Doctoral,

Paloma Morales Gómez

Ana Isabel Haza Duaso



*A mis padres*  
*A mi marido*  
*A mi hija*



*La realización de una Tesis Doctoral constituye un gran reto personal, imposible de culminar sin la colaboración de todos aquellos que de forma directa o indirecta han participado en su elaboración y a quienes agradezco su ayuda y dedico este trabajo.*

*A los directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria durante el periodo de realización de este trabajo investigador, María Dolores Selgas Cortecero y Gonzalo Doroteo García de Fernando Minguillón, por aceptarme en este departamento y por la amabilidad con la que me han tratado siempre.*

*A mis directoras de tesis Paloma Morales y Ana Isabel Haza, gracias por brindarme la oportunidad de formar parte de vuestro grupo de investigación. Me gustaría agradecer vuestra dedicación, apoyo y afecto durante todos estos años, creyendo en mí, incluso cuando ni yo lo hacía. Vuestras inestimables aportaciones, conocimientos transmitidos y consejos han sido fundamentales para la realización de esta tesis.*

*A todos los profesores y personal del Departamento por la amabilidad y generosidad recibida. En especial gracias a Juan Miguel por sacarnos siempre una sonrisa, por su disposición y por sus “milagrosos” probióticos.*

*A todos mis compañeros de laboratorio, gracias por hacer que este camino sea más fácil. Paula gracias por tu vitalidad y por enseñarme cómo cultivar células. Diego, contigo aprendí a ser más paciente y a compartir “cuartito”. Gracias al “grupo de al lado”; Miguel Ángel, Nicolette, Silvia, Inés, Aina y Raquel, a “punto Lab”; Juanjo, Loreto, Cristina, Estefanía, Carlos y Sara, y al “grupo ProbiSearch”; Esther, Irene, Virginia, Susana, Nivia, Marta, Laura, Javi y Rebeca. Gracias a todos por los buenos momentos, por comprenderme y siempre apoyarme. Nicolette, gracias por tu positivismo y por hacernos tan entretenidas las comidas contando tus historias. Silvia, contigo he aprendido muchísimas cosas, de ciencia, informática, galáxias, historia, japonés..., eres una biblioteca andante, ¡vales muchísimo!. Inés, gracias por tus “clases” de inglés y por tus consejos. Aina y Raquel, con vosotras he coincidido al final de este camino, pero tengo que daros las gracias por haberme ayudado a recorrer quizá la parte más difícil. Juanjo y Loreto, a pesar de coincidir poco tiempo, ha sido un*



*placer teneros como compañeros. Cristina, simplemente gracias por ser como eres. Estefanía y Carlos, sois geniales, estoy convencida que llegareis muy lejos, gracias por haber estado ahí siempre que os he necesitado. Sara, gracias por la serenidad que transmites, muy necesaria en algunos momentos, y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Nivia, contigo comparto la aventura de ser madre, gracias por tus conversaciones y por tener siempre un bote de probiótico para mí ☺.*

*Gracias también al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de una Beca Predoctoral (AP2010-0697) de Formación de Profesorado Universitario (FPU), así como la Ayuda para Estancias Breves en el Extranjero, dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad, en Aristotle University of Thessaloniki, Tesalónica (Grecia). Asimismo, el trabajo investigador realizado ha sido posible gracias a los fondos recibidos del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, proyecto AGL2010-16561) y del Banco Santander Central Hispano - Universidad Complutense de Madrid (BSH-UCM, Proyecto GR3/14).*

*I would also like to thank Penelope Mavragani-Tsipidou and Elena Drosopoulou for accepting me in their research laboratory and for supervising my research work during my stay. Thanks to Sofia, María and Voula for their help, for their affection and for making my stay more enjoyable.*

*A mis amigas de siempre y a mis compis de veterinaria, María, Andrea, Tamara, Marta y Pilar gracias por escucharme y ayudarme en este periodo.*

*A mi familia, a mis padres gracias por apoyarme en todas mis decisiones, si he llegado hasta aquí es todo debido a vosotros, gracias por quererme y cuidarme tanto. En especial gracias a mi madre, porque eres un ejemplo a seguir. A mis hermanos, a Sandra, a Lucía y a Maripi simplemente gracias por existir porque sois parte fundamental de mi felicidad. Y por último, a mi marido y a mi hija gracias por estar ahí cada mañana, os quiero.*

*A todos, GRACIAS.*

# ÍNDICE





|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMEN</b> .....  | 1  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 7  |
| <b>GRAPHICAL ABSTRACT</b> .....   | 11 |
| <br><b>CAPÍTULO I</b>   |    |
| <b>EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS</b> .....        | 13 |
| <br><b>CAPÍTULO II</b>  |    |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | 17 |
| <b>II.1. INTRODUCCIÓN A LA NANOTECNOLOGÍA</b> .....                         | 19 |
| II.1.1. Historia de la nanotecnología .....                                 | 23 |
| II.1.2. Definición de nanotecnología .....                                  | 25 |
| <b>II.2. NANOMATERIALES/ NANOPARTÍCULAS</b> .....                           | 27 |
| II.2.1. Concepto .....  | 27 |
| II.2.2. Clasificación .....   | 28 |
| II.2.2.1. Nanomateriales basados en metales.....                            | 29 |
| II.2.2.1.1. Puntos cuánticos .....  | 29 |
| II.2.2.1.2. Nanopartículas de dióxido de titanio .....                      | 29 |
| II.2.2.1.3. Nanopartículas de oro .....                                     | 29 |
| II.2.2.1.4. La plata .....  | 30 |
| II.2.2.1.4.1. Nanopartículas de plata .....                                 | 31 |
| II.2.2.2. Nanomateriales basados en carbono.....                            | 34 |
| II.2.2.2.1. Fullerenos .....  | 34 |
| II.2.2.2.2. Nanotubos de carbono .....                                      | 35 |
| II.2.2.3. Dendrímeros .....   | 35 |
| II.2.2.4. Nanocompuestos.....   | 35 |
| <b>II.3. APLICACIONES DE LA NANOTECNOLOGÍA</b> .....                        | 36 |
| II.3.1. Aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria ..... | 39 |
| II.3.1.1. Producción agrícola .....   | 40 |
| II.3.1.2. Procesado de alimentos, aditivos y suplementos alimentarios ..... | 42 |
| II.3.1.3. Materiales en contacto con alimentos.....                         | 43 |
| II.3.1.4. Productos comerciales con nanomateriales .....                    | 44 |
| <b>II.4. RIESGOS TÓXICOS DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD Y EN EL</b>       |    |
| <b>MEDIO AMBIENTE</b> .....   | 44 |
| II.4.1. Riesgos asociados a la nanotecnología .....                         | 44 |

|   |    |
|---|----|
| II.4.1.1. Factores que afectan a la toxicidad intrínseca de los nanomateriales..... | 48 |
| II.4.1.1.1. Factores químicos .....   | 48 |
| II.4.1.1.2. Factores físicos .....  | 50 |
| II.4.1.2. Exposición a los nanomateriales.....                                      | 52 |
| II.4.1.2.1. Vía inhalatoria .....   | 53 |
| II.4.1.2.2. Vía oral .....  | 54 |
| II.4.1.2.3. Vía dérmica.....  | 55 |
| II.4.1.2.4. Otras vías .....  | 56 |
| II.4.1.3. Toxicidad de los nanomateriales .....                                     | 57 |
| II.4.1.3.1. Mecanismos de toxicidad.....  | 60 |
| II.4.1.3.2. Biocinética de los nanomateriales.....                                  | 65 |
| II.4.1.3.3. Mecanismos de internalización.....                                      | 65 |
| II.4.1.3.4. Transporte y distribución.....  | 68 |
| II.4.1.3.5. Metabolismo .....   | 69 |
| II.4.1.3.6. Eliminación.....  | 69 |
| II.5. LEGISLACIÓN APLICABLE A LA NANOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA .....   | 70 |
| II.6. ETIQUETADO Y REGISTRO DE PRODUCTOS DE CONSUMO CON NANOMATERIALES.....         | 71 |

### **CAPÍTULO III**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>  | <b>75</b> |
| III.1. LÍNEAS CELULARES.....  | 77        |
| III.2. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....                           | 78        |
| III.3. COMPUESTOS QUÍMICOS.....                                       | 79        |
| III.3.1. Nanopartículas de plata.....                                 | 79        |
| III.3.2. N-acetilcisteína (NAC) .....                                 | 79        |
| III.3.3. Benzopireno (BaP).....                                       | 80        |
| III.3.4. Mitomicina c (MMC).....                                      | 80        |
| III.3.5. Etopósido .....  | 80        |
| III.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....           | 81        |
| III.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (MET).....            | 81        |
| III. 4.2. Dispersión de luz dinámica (DLS).....                       | 81        |
| III.5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR .....                   | 83        |
| III.5.1. Método colorimétrico MTT .....                               | 83        |
| III.5.2. Método de liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH)..... | 84        |

|   |    |
|---|----|
| III.6. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD .....   | 86 |
| III.6.1. Evaluación de la genotoxicidad <i>in vitro</i> : electroforesis alcalina de células individuales (ensayo Cometa).....                            | 86 |
| III.6.2. Evaluación de la genotoxicidad <i>in vivo</i> : test de mutación y recombinación (SMART) en alas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....         | 88 |
| III.7. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOXICIDAD DE LAS AgNPs .....   | 89 |
| III.7.1. Determinación de la producción intracelular de las EROs: método del diacetato de 2', 7'- diclorodihidrofluoresceína (H <sub>2</sub> DCFDA) ..... | 89 |
| III.7.2. Determinación del contenido total de glutatión (GSSG/GSH).....   | 91 |
| III.7.3. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) .....   | 92 |
| III.7.4. Determinación de apoptosis .....   | 93 |
| III.7.4.1. Detección morfológica de apoptosis .....   | 93 |
| III.7.4.2. Cuantificación de apoptosis mediante el ensayo Anexina V/IP .....  | 94 |
| III.7.4.3. Cuantificación de apoptosis mediante el método TUNEL .....   | 96 |
| III.7.4.4. Medida de la activación de las caspasas.....   | 97 |
| III.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 99 |

## CAPÍTULO IV

|   |     |
|---|-----|
| RESULTADOS .....  | 101 |
| ARTÍCULO I: <i>In vitro</i> evaluation of silver nanoparticles on human tumoral and normal cells. ....  | 103 |
| ARTÍCULO II: Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells .....   | 113 |
| ARTÍCULO III: Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts.....  | 127 |
| ARTÍCULO IV: Effects of silver and gold nanoparticles of different sizes in human pulmonary fibroblasts.....  | 139 |
| ARTÍCULO V: Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukaemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts ..... | 151 |
| ARTÍCULO VI: <i>In vivo</i> genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on <i>Drosophila</i> .....                   | 163 |
| ARTÍCULO VII: Manufactured silver and gold nanoparticles-induced apoptosis by caspase-pathway in cell lines .....   | 171 |

## **CAPÍTULO V**

|   |            |
|---|------------|
| <b>DISCUSIÓN INTEGRADORA .....</b>                            | <b>185</b> |
| V.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....      | 187        |
| V.2. CITOTOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....       | 189        |
| V.3. GENOTOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....        | 195        |
| V.3.1. Genotoxicidad <i>in vitro</i> .....                    | 196        |
| V.3.2. Genotoxicidad <i>in vivo</i> .....                     | 199        |
| V.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA..... | 202        |
| V.4.1. Estrés oxidativo.....                                  | 202        |
| V.4.2. Apoptosis .....  | 206        |

## **CAPÍTULO VI**

|  |            |
|--|------------|
| <b>CONCLUSIONES- CONCLUSIONS .....</b> | <b>213</b> |
|--|------------|

## **CAPÍTULO VII**

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b> | <b>217</b> |
|--------------------------|------------|

|   |            |
|---|------------|
| <b>APÉNDICES.....</b>                     | <b>257</b> |
| APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS ..... | 259        |
| APÉNDICE 2. LISTADO DE TABLAS .....       | 264        |
| APÉNDICE 3. LISTADO DE FIGURAS.....       | 265        |

# **RESUMEN/ SUMMARY**







El rápido desarrollo de la nanotecnología ha abierto la puerta a la obtención de productos y aplicaciones innovadoras para una amplia gama de sectores de la industria y el consumo. Se estima que de todos los nanomateriales utilizados en productos para el consumo, las nanopartículas de plata (AgNPs) son las que tienen un mayor grado de comercialización. Sin embargo, a pesar de las innumerables aplicaciones que presentan, poco se sabe sobre su toxicidad, planteando un riesgo para la salud humana y el medio ambiente debido a sus propiedades específicas y su potencial uso y exposición. Es por ello que el objetivo principal de este trabajo de investigación ha consistido en “Evaluar los riesgos toxicológicos de nanopartículas de plata (AgNPs) de diferentes tamaños en líneas celulares humanas y en *Drosophila melanogaster*. Así como, en determinar los posibles mecanismos de acción por los que estas AgNPs ejercen su efecto tóxico”.

Para realizar una correcta evaluación de la seguridad de las nanopartículas (NPs) se requiere previamente su caracterización, mediante un estudio de sus propiedades fisicoquímicas, en las que se incluye el tamaño, la distribución del tamaño, la morfología y la aglomeración de NPs, entre otros, ya que se ha observado que todos estos parámetros pueden influir en la toxicidad de las mismas. En la fase inicial de este trabajo, se caracterizaron las AgNPs de tamaño 4.7, 42 y 157 nm en solución acuosa y tras la incubación en medio de cultivo, utilizando el microscopio electrónico de transmisión (MET) y la dispersión de luz dinámica (DLS). Las AgNPs de 4.7 y 42 nm presentaron una morfología esférica, de múltiples facetas y bien dispersas, mientras que las AgNPs de 157 nm presentaron una morfología más ovalada. El tamaño primario de las AgNPs coincidió con el proporcionado por el fabricante, excepto en las AgNPs de 157 nm en las cuales obtuvimos un tamaño ligeramente menor al del proveedor. Por otra parte, se observó la aglomeración de las AgNPs después de la incubación de las mismas a 37°C durante 24 horas en medio de cultivo libre de células.

A continuación, para evaluar la citotoxicidad inducida por las AgNPs de 4.7, 42 y 157 nm de tamaño se utilizaron líneas celulares humanas, diana de la exposición de las mismas: hepatoma (HepG2), leucemia (HL-60), fibroblastos de piel (NHDF) y fibroblastos de pulmón (HPF), empleando los métodos MTT y LDH. Las AgNPs de 4.7, 42 y 157 nm disminuyeron significativamente la viabilidad celular de manera dosis y tiempo dependiente en las cuatro líneas, excepto las de 157 nm en las células NHDF, en las cuales no se observó efecto citotóxico. Como era de esperar, las AgNPs de menor tamaño (4.7 nm) fueron las más

citotóxicas. Además, se observó claramente que las células HepG2 fueron mucho más sensibles al tratamiento con las AgNPs que las otras tres líneas celulares. Las AgNPs de 157 nm fueron descartadas de nuestro estudio debido a su tamaño (superior a 100 nm) y a la imposibilidad de determinar el valor IC<sub>50</sub> (concentración de inhibición del 50% de la viabilidad celular).

Seguidamente, se evaluó el daño al ADN de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las líneas celulares HepG2, HL-60, NHDF y HPF. Para ello se utilizó el método de la electroforesis alcalina de células individuales o ensayo Cometa, incluyendo además una modificación, que consistió en utilizar las enzimas formamidopirimidina-DNAglicosilasa (Fpg) y endonucleasa III (Endo III), que reconocen las purinas y las pirimidinas oxidadas, respectivamente. Ambas AgNPs indujeron una ruptura significativa de las cadenas de ADN después de 24 horas de tratamiento en las cuatro líneas celulares, siendo las AgNPs de 4.7 nm más genotóxicas que las de 42 nm. Además, cuando las células fueron incubadas conjuntamente con las enzimas Fpg y Endo III y las AgNPs, se observó un incremento elevado del daño oxidativo al ADN, excepto en las células HPF tratadas con las AgNPs de 42 nm. La genotoxicidad de las AgNPs de 4.7 y 42 nm también fue evaluada *in vivo* empleando el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART Test) en alas de *Drosophila Melanogaster*. Ninguna de las dos AgNPs evaluadas indujeron un incremento significativo en la frecuencia de clones mutantes en las alas de las moscas adultas. Sin embargo, observamos defectos en la pigmentación de la cutícula y reducción de la capacidad de movimiento de las moscas adultas después de la ingestión de las AgNPs durante la fase larvaria, sugiriendo una respuesta frente al estrés oxidativo.

Posteriormente, estudiamos los posibles mecanismos de acción por los que estas AgNPs ejercen su efecto tóxico. Se utilizó el diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) para detectar la producción intracelular de las especies reactivas del oxígeno (EROs) inducida por las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las cuatro líneas celulares y la N-acetilcisteína (NAC) como antioxidante. La producción de las EROs aumentó después de la exposición de las células a las AgNPs (4.7 y 42 nm) y fue dependiente del tamaño de las AgNPs y de la línea celular, siendo las AgNPs de 4.7 nm las que indujeron la mayor producción de las EROs en las células HepG2. El pretratamiento con la NAC inhibió completamente la citotoxicidad inducida por las AgNPs de 4.7 y 42 nm. La acción de moléculas intracelulares antioxidantes (glutatión) y la regulación de la actividad de enzimas

antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) también fueron evaluadas. Ambas AgNPs provocaron una drástica disminución del contenido total de glutatión en las cuatro líneas celulares. Aunque los niveles de SOD también disminuyeron, su descenso no fue estadísticamente significativo en ninguna de las líneas evaluadas.

Finalmente, determinamos la inducción de apoptosis por las AgNPs de 4.7 y 42 nm en dos líneas tumorales humanas, HepG2 y HL-60, utilizando diferentes técnicas como la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo (ensayo Anexina V/IP, TUNEL y activación de caspasas). La línea celular HepG2 mostró una mayor sensibilidad a la inducción de apoptosis por las AgNPs de 42 y 4.7 nm, presentando estas últimas AgNPs un mayor efecto apoptótico. Además, la apoptosis inducida por las AgNPs de 4.7 y 42 nm fue dependiente de la activación de las caspasas en ambas líneas celulares, actuando las caspasas -3 y -7 como caspasas efectoras.

En conclusión, las AgNPs de 4.7 y 42 nm son citotóxicas y genotóxicas en las líneas celulares HepG2, HL-60, NHDF y HPF. El efecto tóxico de las AgNPs es dependiente del tamaño, presentando las AgNPs más pequeñas un potencial tóxico mayor. Además, el efecto tóxico de las AgNPs depende de la línea celular, siendo las células HepG2 las más sensibles. El principal mecanismo de toxicidad de estas AgNPs es el estrés oxidativo, a través de la producción de las EROs y la reducción de enzimas y moléculas antioxidantes. Ambas AgNPs indujeron apoptosis dependiente de caspasas.



The rapid development of nanotechnology has opened the door to innovative products and applications for a wide range of industry and consumer sectors. It is estimated that of all the nanomaterials used in consumer products, silver nanoparticles (AgNPs) currently have the highest degree of commercialization. However, despite the innumerable applications they present, little is known about their toxicity, posing a risk to human health and the environment due to its specific properties and potential use and exposure. For this reason, the main objective of this research work was to "Evaluate the toxicological risks of silver nanoparticles (AgNPs) of different sizes in human cell lines and in *Drosophila melanogaster*. As well as, determine the possible mechanisms of action by which these AgNPs exert their toxic effect ".

To evaluate the safety of the nanoparticles (NPs), their characterization is needed previously, through a study of their physicochemical properties, including size, size distribution, morphology and agglomeration of NPs among others, since it has been observed that all these parameters can influence the toxicity thereof. First, AgNPs of size 4.7, 42 and 157 nm are characterized in the aqueous solution and incubation in the culture medium, using the transmission electron microscope (TEM) and dynamic light scattering (DLS). The AgNPs of 4.7 and 42 nm had a spherical morphology, multi-faceted and well dispersed, whereas the AgNPs of 157 nm presented a oval morphology. The primary AgNPs size coincided with the supplier by the manufacturer, except for the 157 nm AgNPs in which we obtained a slightly smaller supplier size. Agglomeration of AgNPs was observed after incubation of the AgNPs at 37 ° C for 24 hours in cell-free culture medium.

Next, to evaluate the cytotoxicity induced by AgNPs of 4.7, 42 and 157 nm in size, human target cell lines were used for their exposure: hepatoma (HepG2), leukemia (HL-60), skin fibroblasts (NHDF) and lung fibroblasts (HPF), using the MTT and LDH methods. AgNPs of 4.7, 42 and 157 nm significantly decreased cell viability in a dose and time dependent manner in the four lines, except those of 157 nm in the NHDF cells, in which no cytotoxic effect was observed. As expected, smaller AgNPs (4.7 nm) were the most cytotoxic. In addition, it was clearly observed that HepG2 cells were much more sensitive to treatment with AgNPs. AgNPs of 157 nm were discarded from our study because of their size (greater than 100 nm) and the inability to determine the IC<sub>50</sub> value (inhibition concentration 50% of cell viability).

Then, the DNA damage of AgNPs of 4.7 and 42 nm was evaluated in the HepG2, HL-60, NHDF and HPF cell lines. For this purpose, the alkaline electrophoresis method of individual cells or the Cometa assay was used. The Comet assay was modified using enzymes formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III), which uncover the oxidized purines and pyrimidines, respectively. Both AgNPs induced a significant DNA strand breaks after 24 hours of treatment in the four cell lines. AgNPs of 4.7 nm were more genotoxic than 42 nm. In addition, the cells exposed to AgNPs and incubated with Fpg or Endo III enzymes showed a high oxidative DNA damage, except in HPF cells treated with the 42 nm AgNPs. *In vivo* genotoxicity of AgNPs of 4.7 and 42 nm was also evaluated using the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila Melanogaster* wings. None of the two AgNPs tested induced a significant increase in the frequency of mutant clones in the wings of adult flies. However, defects in cuticle pigmentation and reduced movement ability of adult flies were observed after ingestion of AgNPs during the larval phase, suggesting a response to oxidative stress.

Subsequently, the feasible mechanisms of action by which these AgNPs exert their toxic effect were analysed. Reactive oxygen species (ROS) production induced by AgNPs of 4.7 and 42 nm was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) in the four cell lines and N-acetylcysteine (NAC) was used as an antioxidant. The production of ROS occurred immediately after exposure of cells to AgNPs (4.7 and 42 nm) and in a size and cell line-dependent manner. AgNPs of 4.7 nm induced the highest production of EROs in HepG2 cells. The pretreatment with NAC completely inhibited the cytotoxicity induced by AgNPs of 4.7 and 42 nm. The action of intracellular antioxidant molecules (glutathione) and regulation of the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) were also evaluated. Both AgNPs caused a dramatic decrease in total glutathione content in the four cell lines. Although SOD levels also decreased, their decline was not statistically significant in any of the lines evaluated.

Finally, the induction of apoptosis by AgNPs of 4.7 and 42 nm was investigated in two human tumour cell lines: HepG2 (hepatoma) and HL-60 (leukemia), using different techniques such as fluorescence microscopy and flow cytometry (Annexin V/PI, TUNEL assays and Caspase activation). HepG2 cells was the most sensitive cell line to

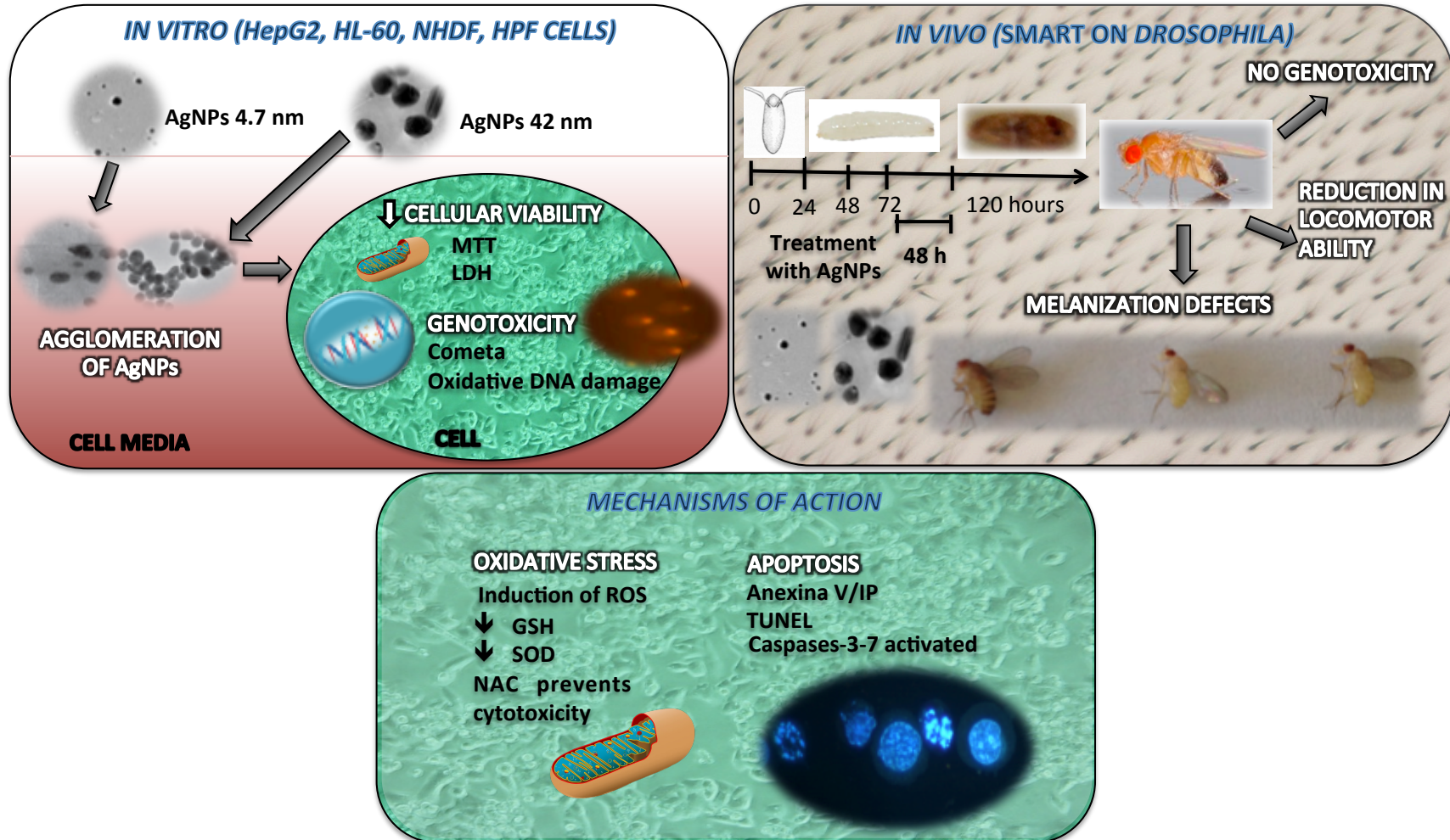
the induction of apoptosis by AgNPs 4.7 and 42 nm, and AgNPs of 4.7 nm seems to have higher apoptotic effect than AgNPs of 42 nm. The apoptosis induced by both AgNPs was caspase-dependent pathway in HepG2 and HL-60 cell lines, being both caspase-3 and -7 the effector caspases.

In conclusion, the AgNPs of 4.7 and 42 nm are cytotoxic and genotoxic in the HepG2, HL-60, NHDF and HPF cell lines. The toxic effect of AgNPs is size dependent, with smaller AgNPs having a higher toxic potential. In addition, the toxic effect of AgNPs depends on the cell line, with HepG2 cells being the most sensitive. The main mechanism of toxicity of these AgNPs is oxidative stress, through the production of ROS and the reduction of antioxidant enzymes and molecules. Both AgNPs induced apoptosis by caspases dependent pathway.





# GRAPHICAL ABSTRACT





# CAPÍTULO I



*Exposición general del problema a investigar:*  
*Objetivos*



En la actualidad, cada vez es mayor el uso de los nanomateriales (NMs) en productos de consumo gracias a las numerosas ventajas que presentan y que hacen que los productos que los contienen sean más competitivos en el mercado. Así, se ha pasado en muy poco tiempo de una situación en la que prácticamente no existían NMs en nuestro entorno, a estar rodeados por una gran variedad de productos que los contienen en su composición. A día de hoy, se conocen más de 1814 productos que contienen nanomateriales distribuidos en diferentes sectores (Vance y col., 2015). Se estima que de todos los NMs utilizados en productos para el consumo, las nanopartículas de plata (AgNPs) son las que tienen un mayor grado de comercialización (Piao y col., 2011). Se utilizan en electrónica, ropa, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, aplicaciones biomédicas, en la industria médico-farmacéutica y alimentaria (Bartlomiejczyk y col., 2013)..

El desarrollo de la nanotecnología, no obstante, tiene que ir acompañado de estudios de toxicidad que permitan conocer los efectos que estas NPs van a tener tanto en la salud humana como en el medio ambiente. Sin embargo, a pesar de las innumerables aplicaciones que presentan, actualmente poco se sabe sobre su toxicidad, planteando un riesgo para la salud humana y el medio ambiente debido a sus propiedades específicas y su potencial uso y exposición (Amenta y col., 2015). Por el momento, no existe ninguna legislación específica sobre la nanotecnología y los NMs, aunque éstos están dentro de la definición de “sustancia” incluida en la Regulación Europea de Sustancias Químicas (REACH). En este sentido, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria publicó una Guía de Orientación para evaluar los riesgos de las aplicaciones de la nanociencia y de las nanotecnologías en los alimentos y en la cadena alimentaria (EFSA Comité Científico, 2011a). Una de sus recomendaciones consistía en la necesidad de evaluar el riesgo potencial de las NPs caso por caso de forma individual, teniendo en cuenta entre otras características el NM y su tamaño.

Considerando todo lo expuesto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha consistido en “Evaluar los riesgos toxicológicos de nanopartículas de plata (AgNPs) de diferentes tamaños en líneas celulares humanas y en *Drosophila melanogaster*. Así como, en determinar los posibles mecanismos de acción por los que estas AgNPs ejercen su efecto tóxico”. Para lograr el objetivo principal del trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido necesario desarrollar y alcanzar los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización de nanopartículas de plata de diferentes tamaños, 4.7, 42 y 157 nm, utilizando el microscopio electrónico de transmisión y la dispersión de luz dinámica.
2. Evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas de plata de 4.7, 42 y 157 nm de tamaño en las líneas celulares humanas tumorales de hepatoma (HepG2), leucemia (HL-60) y fibroblastos humanos de piel (NHDF) y de pulmón (HPF).
3. Evaluación de la genotoxicidad de las nanopartículas de plata de 4.7 y 42 nm de tamaño.
  - 3.1. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro* (ruptura de las cadenas de ADN y daño oxidativo al ADN) de las AgNPs en las líneas celulares humanas HepG2, HL-60, NHDF y HPF, utilizando el ensayo Cometa.
  - 3.2. Evaluación de la genotoxicidad *in vivo* de las AgNPs empleando el Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en alas de *Drosophila Melanogaster*.
4. Mecanismos de acción implicados en la toxicidad de las nanopartículas de plata de 4.7 y 42 nm de tamaño.
  - 4.1. Inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno en las líneas celulares humanas HepG2, HL-60, NHDF y HPF.
  - 4.2. Reducción de los niveles del glutatión y la actividad de la superóxido dismutasa en las líneas celulares humanas HepG2, HL-60, NHDF y HPF.
  - 4.3. Inducción de apoptosis en las líneas celulares humanas tumorales HepG2 y HL-60.

## CAPÍTULO II

### *Introducción*





## **II.1. INTRODUCCIÓN A LA NANOTECNOLOGÍA**

La materia presenta fenómenos únicos en la escala nanométrica (1-100 nm). Llegar a conocer y comprender estos fenómenos y disponer de herramientas y métodos para generar materia con unas propiedades específicas, es el propósito conjunto de la ciencia, la ingeniería y la tecnología de la escala nano. El avance en paralelo de la nanociencia, la comprensión del comportamiento de la materia en la nanoescala, y de la nanotecnología, con el desarrollo de instrumentos y métodos para la manipulación de la materia en la escala nanométrica, han permitido producir nuevas estructuras, materiales y dispositivos, que básicamente reestructurarán las tecnologías de uso actual para la industria, la medicina, la defensa, la producción de energía, la gestión del medio ambiente, el transporte, la comunicación, la computación y la educación. Los nanomateriales (NMs) se incorporan cada vez más a los productos comerciales (Vance y col., 2015).

La nanotecnología promete ser la tercera revolución industrial. Se perfila como un conjunto de revoluciones tecnológicas multidisciplinarias que permitirá a la sociedad maximizar la eficiencia en los procesos productivos y sociales (Cornejo, 2014). El futuro alcance de los posibles desarrollos es desconocido, ya que se encuentra en una constante evolución con resultados asombrosos, no obstante esta base innovadora es la razón de ser de la importancia de esta nueva industria para la sociedad, con un considerable impacto en la mayoría de los sectores industriales y potencial de aplicaciones en cualquier tipo de producto.

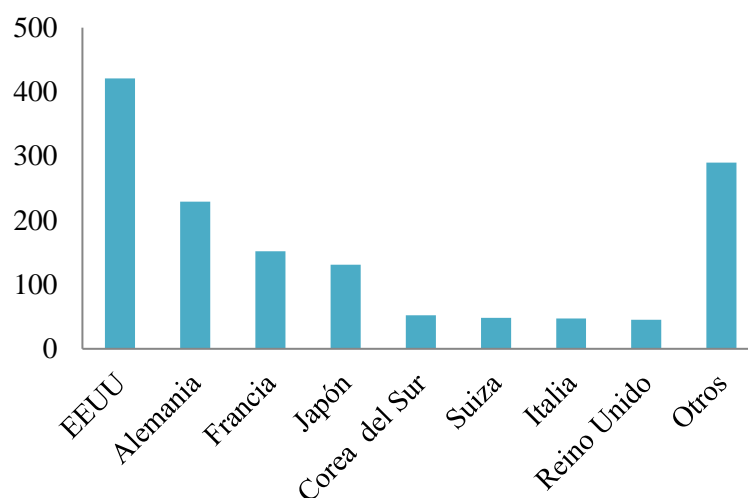
Los nuevos avances tecnológicos ya han abierto en los últimos años una industria multimillonaria. Las fabulosas expectativas generadas por el potencial de bienestar, innovación y de impacto económico de la nanotecnología se reflejan en la creciente inversión tanto pública como privada en I+D en todos los países, la continua producción científica, la intensa actividad en el campo de la regulación y normativa, actualmente en fase de desarrollo, y el establecimiento de estrategias y políticas nacionales y de alianzas entre los principales agentes implicados, tanto a nivel gubernamental, industrial y de investigación (Galera, 2015). Tanto es así, que entre 2001 y 2008 el número de descubrimientos, patentes, trabajadores en nanotecnología, programas de financiación de la I+D y de mercados, creció a una tasa media anual del 25% (Roco, 2011).

Se estima que en los próximos años se producirá un crecimiento espectacular del mercado asociado al producto nanotecnológico, incrementando la tendencia existente en los primeros años de vida de esta industria emergente. En concreto, partiendo de un mercado de 200 mil millones de € en 2009, en 2015 se alcanzarán los 2 billones de € (Forfás, 2010). Así mismo, previsiones como la publicada por la consultora Lux Research en Febrero de 2014, indican que las ventas relacionadas con el sector nanotecnológico (incluyendo todo tipo de productos) ascenderán a 4,4 billones de € en 2018 (Lux Research, 2014). Todavía no se dispone de información suficiente para evaluar si dichas estimaciones se han ido cumpliendo hasta la fecha, sin embargo, los estudios más recientes indican unas ligeras diferencias en negativo con respecto a las estimaciones anteriores (Lux Research, 2014). Parece probable que en dicha diferencia tengan influencia las problemáticas reglamentarias surgidas como respuesta al cierto nivel de alerta en relación a la toxicidad de las nanopartículas (NPs), y que pueden haber frenado sensiblemente tal incremento. En todo caso, no cabe duda que las ventajas asociadas a la inversión en nanotecnologías, compensarán cualesquiera que sean los gastos relacionados con la implementación de las medidas reglamentarias que sean obligatorias.

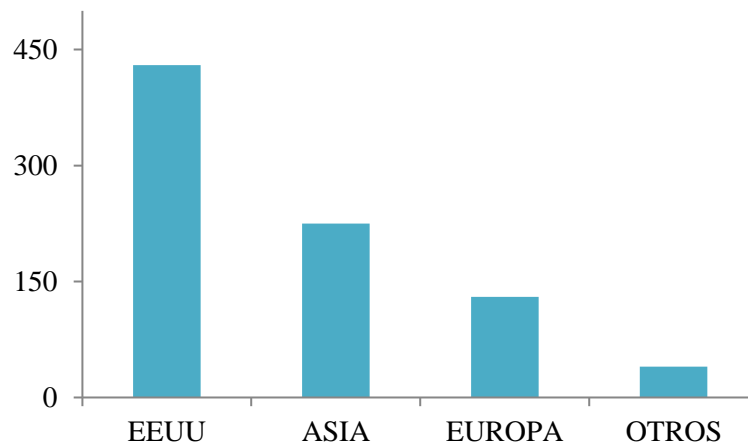
Estas aplicaciones serán esenciales para la competitividad de una amplia gama de productos de la UE en el mercado mundial. También existen muchas PYME y empresas semilla de reciente creación en este ámbito de la alta tecnología. Cabe destacar además, el beneficio a nivel de creación de empleo en el sector. En 2012, el empleo directo en los sectores nanotecnológicos en la UE oscilaba entre 300.000 y 400.000 puestos de trabajo, con tendencia al alza (Comisión Europea, 2012). La mayor parte de la actividad relacionada con la nanotecnología se lleva a cabo en los países de mayor grado de industrialización. Pese a que las economías emergentes muestran una rápida progresión en términos de producción y desarrollo, éstas se mantienen en un segundo plano con respecto a las tres principales potencias nanotecnológicas que son Estados Unidos, Unión Europea y las regiones del este de Asia (Japon, Korea, China y Taiwan) (StatNano, 2015).

En términos de número de patentes en el ámbito nanotecnológico, Estados Unidos se encuentra claramente a la cabeza, tal y como muestra la **Figura 1**. Cabe destacar que el lanzamiento de nuevos productos nanotecnológicos se distribuye entre las potencias mencionadas, donde Estados Unidos se sitúa como líder en solitario (**Figura 2**). Sin embargo, el conocimiento que actualmente se tiene del mercado nanotecnológico es poco profundo y

adolece de falta de detalle. En términos de impacto industrial y de exposición pública los principales NMs presentes en el mercado, requieren de la creación inmediata de un marco regulatorio.



**Figura 1.** Número de patentes de nanotecnología en la EPO (European Patent Office) en 2015 (StatNano, 2015).



**Figura 2.** Número de productos nanotecnológicos por zonas geográficas (Palmberg y col., 2009).

Según los estudios de mercado realizados hasta la fecha, la cantidad global de NMs comercializados a nivel mundial se encuentra sobre los 11,5 millones de toneladas, con un valor de mercado aproximado de 20 mil millones de € (Comisión Europea, 2012). El negro de carbón y la sílice amorfa representan, con mucha diferencia, el mayor volumen de los

NMs que existen actualmente en el mercado, y se vienen utilizando en una amplia gama de aplicaciones. En la actualidad, el grupo de materiales que más reclama la atención está constituido por el nanodióxido de titanio, el nanóxido de zinc, los fullerenos, los nanotubos de carbono y la nanoplata (Comisión Europea, 2012). Dichos materiales se comercializan en cantidades manifiestamente más pequeñas que los materiales tradicionales, pero la utilización de algunos de ellos va en rápido aumento. Al mismo tiempo, se van desarrollando otros nuevos NMs y aparecen nuevos usos. Muchos se utilizan en aplicaciones innovadoras como los catalizadores, la electrónica, los paneles solares, las baterías y las aplicaciones biomédicas, incluyendo el diagnóstico y las terapias oncológicas (Arivalagan y col., 2011).

La política Europea en materia de Nanotecnología se inició con el “Plan de acción para Europa 2005-2009 en nanociencia y nanotecnología”. Durante el periodo 2007-2011 dentro del séptimo Programa Marco (7PM), se destinaron 2.560 millones de € a la investigación en nanociencia y nanotecnología. El esfuerzo en inversión para afianzar la nanotecnología como motor de innovación no sólo se mantiene, sino que ha aumentado. De especial significación ha sido la designación del programa Grafeno como uno de los dos buques insignia de la investigación europea, con una dotación de 1.000 millones de € para una duración de 10 años (Comisión Europea, 2013).

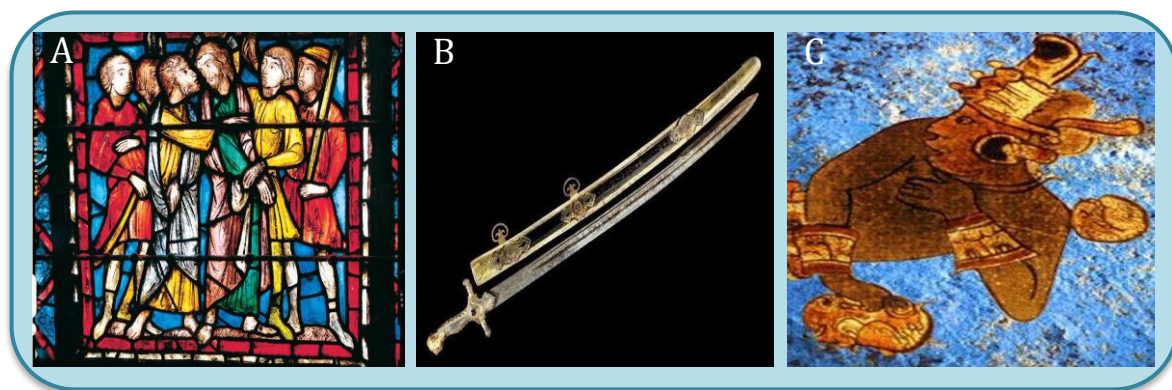
Hay sin embargo un aspecto no resuelto y es el de las consecuencias ambientales y sobre la salud humana asociados a la nanotecnología. La importancia de los aspectos de seguridad y salud humana y ambiental en relación con la nanotecnología, radica en que es el factor limitante del crecimiento del mercado de los productos y servicios con nanotecnología aplicada. Ante el panorama de desarrollo nanotecnológico descrito se deriva que las primeras personas expuestas a potenciales riesgos nano serán las que, de un modo u otro, sintetizan (la síntesis de NMs es una de las principales fuentes de potencial riesgo), manejan o están en contacto con NMs, componentes o productos ya acabados, en sus puestos o lugares de trabajo. En este terreno, el de la seguridad y salud en el trabajo (SST), impera la incertidumbre sobre el impacto potencial para la salud de los trabajadores expuestos a NMs en las empresas donde se fabrican o utilizan. La organización mundial del trabajo (OIT) ha llamado la atención acerca del enorme desfase entre el conocimiento en las aplicaciones de la nanotecnología y el de su impacto en la salud, brecha que la Agencia Europea para la Seguridad y Salud en el Trabajo (EU-OSHA) cuantifica en 20 años, en su informe de 2014

titulado “Prioridades para la investigación sobre seguridad y salud laboral en Europa: 2013-2020”.

### **II.1.1. Historia de la nanotecnología**

Puede que la palabra “nanotecnología” haga pensar que es algo actual, cosa de hace pocos días o incluso del futuro, pero lo cierto es que esta estrategia de llegar a la dimensión más diminuta de una partícula es posible y se lleva utilizando desde hace muchísimo tiempo. Desde hace millones de años en la naturaleza existen una multitud de entidades y procesos que funcionan en la escala nanométrica, algunos ejemplos son las partículas de negro humo, bacterias que sintetizan NPs en su interior o flagelos pluricelulares que funcionan como nanomotores de engranajes, etc.

La nanotecnología fue usada en siglos pasados por el hombre, aprovechando las propiedades ópticas y medicinales de las NPs, sin saber que se trataba de una nueva y revolucionaria tecnología (Schmid, 2005). Respecto a sus primeros usos puede citarse el caso de la cultura egipcia, que, en el año 4000 a.C., empleaba NPs de sulfuro de plomo (de 5 nm) como tintes para el cabello. También usaban NPs de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener buena salud y la civilización china, que además de utilizarlas con fines curativos, también las empleaban como colorantes inorgánicos en porcelanas. Otros ejemplos significativos son las vidrieras coloreadas con NPs de oro de las catedrales góticas, las espadas de Damasco, cuyo acero estaba reforzado por nanotubos de carbono por su peculiar fabricación y el increíblemente bien conservado color azul de los objetos arqueológicos de origen Maya, debido a que el colorante se incrustaba en nanocavidades de filosilicatos que lo han preservado de los agentes atmosféricos durante siglos (**Figura 3**) (Reibold y col., 2006; Reyes-Valerio, 1993). Un caso especialmente curioso es el vaso de Lycurgus, creado por los romanos en el siglo IV d.C. (Freestone y col., 2007). Este vaso aún se muestra en exhibición en el Museo Británico y tiene una característica muy interesante; a la luz del día presenta colores verdosos, y cuando es iluminado desde su interior adquiere un color rojizo, como se observa en la **Figura 4**. Los análisis de este vaso muestran que está compuesto de una matriz de vidrio que contiene una pequeña cantidad de NPs metálicas de oro y plata, responsables de este fenómeno óptico.

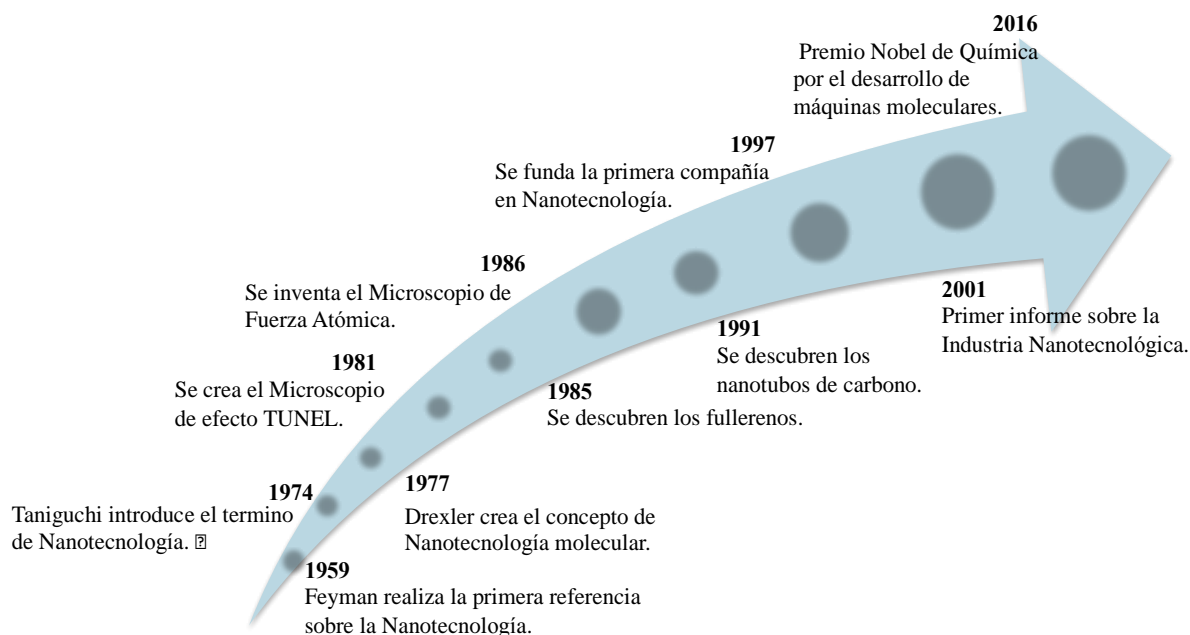


**Figura 3.** Vidriera gótica con NPs de oro (A), espada de Damasco (B) y pintura con azul maya (C).



**Figura 4.** Vaso de Lycurgus. Vista con luz reflejada (A) y luz transmitida. (B).

Las ideas y conceptos de la nanotecnología surgieron tras una conferencia titulada “Hay mucho sitio al fondo” del físico Richard Feynman en una reunión de la Sociedad Americana de Física en el Instituto de Tecnología de California (Caltech), el 29 de diciembre de 1959. En ella, Feynman describió un proceso por el cual los científicos serían capaces de manipular y controlar átomos y moléculas individuales. Una década más tarde, el profesor Norio Taniguchi acuñó el término de nanotecnología, aunque no fue hasta 1981, con el desarrollo del microscopio de efecto túnel cuando se pudieron “observar” los átomos individuales, cuando comenzó la nanotecnología moderna. Un breve resumen de la historia cronológica de la nanotecnología se muestra en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Historia cronológica de la Nanotecnología.

### II.1.2. Definición de nanotecnología

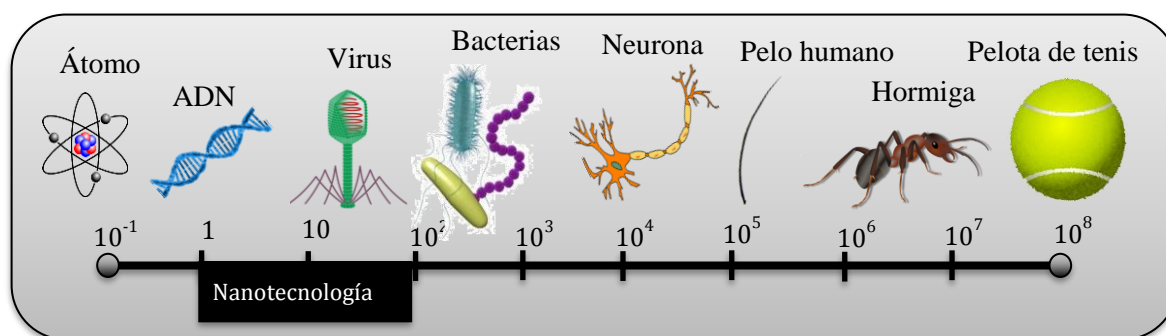
Actualmente, no existe un consenso sobre la definición de nanotecnología, sin embargo, una de las más ampliamente utilizadas es la adoptada por la Royal Society and the Royal Academy of Engineering (2004), la cual la define como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas controlando el tamaño y la forma a escala nanométrica. La **Tabla 1** muestra una visión general de alguna de las definiciones de nanotecnología usadas por la comunidad científica, organismos de financiación y propiedades intelectuales del mundo.

“Nano” es un prefijo griego que significa diminuto, enano, pequeño. Este prefijo se utiliza en el sistema internacional (S.I.) de unidades para indicar un factor de  $10^{-9}$  es decir, la millonésima parte de algo. Por tanto, un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro, una longitud 60.000 veces más pequeña que el diámetro de un cabello humano y 10 veces el diámetro de un átomo de hidrógeno (Corbertt y col., 2000). La **Figura 6** muestra diferentes objetos con sus tamaños característicos.



**Tabla 1.** Definiciones de nanotecnología.

| Fuente  | Definición   |
|---|--|
| International patent classification (IPC) subclase B82B | <p>“Nanoestructura” es “un ordenamiento atómico preciso de la materia que tiene una configuración particular de la forma incluyendo al menos un elemento integral esencial que:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(i) está formada exclusivamente a partir de un átomo, una molécula o una colección muy limitada de átomos o moléculas, colección que en su totalidad es indetectable por un microscopio óptico; y</li> <li>(ii) se ha formado por tener sus átomos o moléculas manipuladas individualmente como discretas unidades durante su fabricación”</li> </ul> |
| physics.about.com                                       | “El desarrollo y la utilización de dispositivos que tienen un tamaño de sólo unos pocos nanómetros”  |
| hyperdictionary.com                                     | “La rama de la ingeniería que se ocupa de las cosas menores de 100 nm (especialmente con la manipulación de las moléculas individuales)”   |
| NASA  | “Nanotecnología es la creación de materiales funcionales, dispositivos y sistemas a través del control de la materia en la escala nanométrica (1-100 nm), y la explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicos, biológicos, mecánicos, eléctricos...) en esta misma escala”   |
| International standard organization (ISO, 2010)         | “Aplicación del conocimiento científico para manipular y controlar la materia a escala nanométrica con el fin de hacer uso de sus propiedades y fenómenos relacionados con su tamaño y estructura, a diferencia de los asociados con átomos o moléculas individuales o con materiales a granel”  |
| Fundación española para la ciencia y tecnología (FECYT) | “Tecnología generada con objetos cuyo tamaño oscila desde una décima de nanómetro a una centena de nanómetro”  |



**Figura 6.** Escala comparativa de objetos macro, micro y nano.

## II.2. NANOMATERIALES/ NANOPARTÍCULAS

### II.2.1. Concepto

Según la recomendación de la Comisión Europea del 18 de octubre de 2011a, nanomaterial se define como “*un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm*”. Los términos partícula, aglomerado y agregado se definen como:

«partícula»: una parte diminuta de materia con límites físicos definidos.

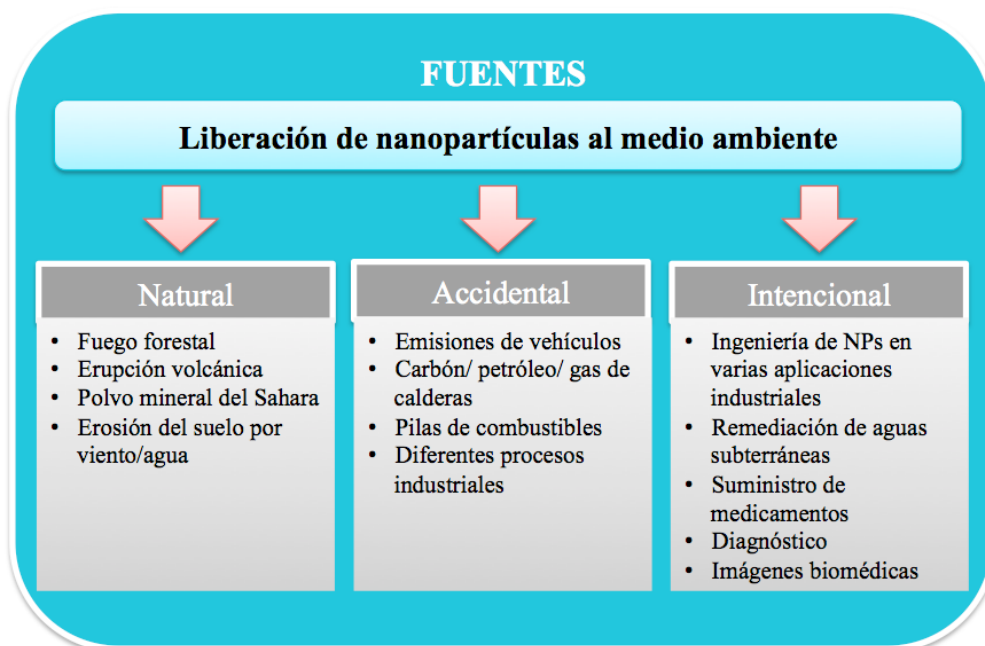
«aglomerado»: un conjunto de partículas débilmente ligadas o de agregados en que la extensión de la superficie externa resultante es similar a la suma de las extensiones de las superficies de los distintos componentes.

«agregado»: una partícula compuesta de partículas fuertemente ligadas o fusionadas.

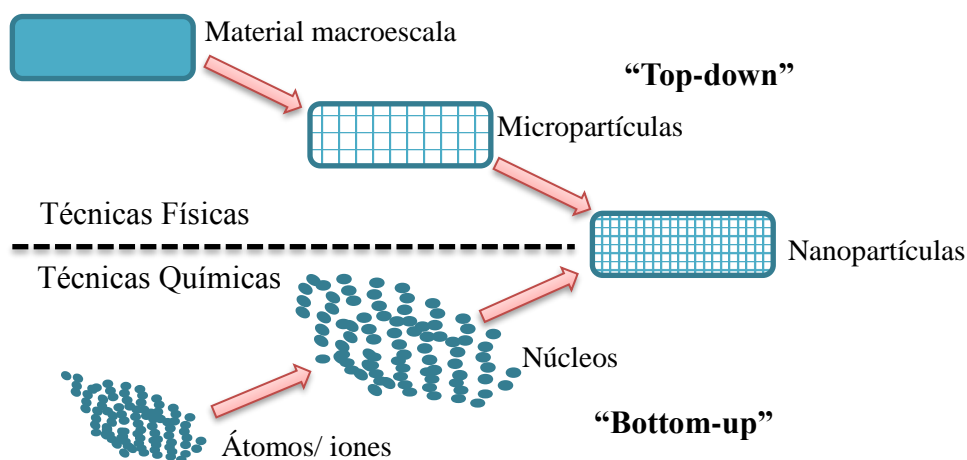
Según la ISO TS 80004-1, un nanomaterial es un material que presenta al menos una dimensión en la escala nanométrica o que posee una estructura interna o de superficie en dicha escala.

Las fuentes de NPs pueden ser clasificadas como naturales o como derivadas de actividades antropogénicas intencionales o accidentales (**Figura 7**). Los NMs artificiales o manufacturados, son aquellos de producción humana intencional con propósitos de aplicación precisos y con unas propiedades específicas. Algunos de ellos llevan años instalados en el mercado en tonelajes significativos como el negro de carbón, el dióxido de titanio, el aluminio, el carbonato de calcio o la sílice amorfa. Otros, más recientes se fabrican en cantidades mucho menores, como los nanotubos de carbono, los dendrímeros, las gotas cuánticas o el grafeno. Estos pueden ser fabricados a través de dos métodos principales; “top-down” moliendo materiales a granel o “bottom-up” mediante la síntesis química o auto-ensamblaje de compuestos más pequeños (**Figura 8**) (Forough y Farhadi, 2010; Pal y col., 2011). Los NMs accidentales son también de origen humano, pero se distinguen de los artificiales en que no han sido producidos de forma intencionada, sino que son resultado, generalmente, de procesos mecánicos o térmicos como los humos de soldadura, los humos de los motores de combustión etc. En la naturaleza también hay presentes NMs como las cenizas

volcánicas o la sal de mar en suspensión en el aire (Galera, 2015).



**Figura 7.** Fuentes comunes de NPs en el medio ambiente (Smitha y col., 2012).



**Figura 8.** Principales métodos para la fabricación de NPs.

### II.2.2 Clasificación

En teoría, los NMs o NPs pueden ser procesados a partir de casi cualquier sustancia química (Dreher, 2004), por lo que su diversidad es muy extensa. Los principales tipos de NMs son los basados en metales, en carbono, dendrímeros y nanocompuestos (Gutierrez-Praena y col., 2009).

### ***II.2.2.1. Nanomateriales basados en metales***

En ellos se incluyen los puntos cuánticos y NPs de metales como la plata y oro y óxidos de metales, tales como el dióxido de titanio.

#### ***II.2.2.1.1. Puntos cuánticos***

Los puntos cuánticos consisten en cristales coloidales semiconductores muy compactos, compuestos por cientos o miles de átomos ordenados en una estructura cristalina de forma habitualmente esférica. Son ampliamente utilizados en el sector biomédico, especialmente en el ámbito del análisis clínico, no obstante, existe un gran potencial de aplicación en ámbitos como la nanomedicina regenerativa, terapia genética y oncológica, entre otros. Así mismo, se vislumbran aplicaciones a nivel de optoelectrónica, criptografía o computación cuántica y energías renovables (Pombo y Goyanes, 2011).

#### ***II.2.2.1.2. Nanopartículas de dióxido de titanio***

El dióxido de titanio es uno de los pigmentos minerales sintéticos más utilizados en el mundo en las últimas décadas, sus aplicaciones destacan en el campo de las pinturas, cosméticos, plásticos, papel y tintas, entre otros, y tiene una presencia masiva en el ámbito alimentario. Así mismo, sus propiedades fotocatalíticas le permiten descomponer una gran variedad de materias orgánicas e inorgánicas, haciendo que su utilización sea creciente en nuevos ámbitos, como por ejemplo el de la construcción, dadas sus características autolimpiadoras y antipolutivas (Ruiz, 2015).

#### ***II.2.2.1.3. Nanopartículas de oro***

Las NPs de oro (AuNPs) destacan especialmente por sus propiedades fototerapéuticas. En presencia de luz láser las AuNPs se activan y desprenden calor, siendo muy útiles en el tratamiento selectivo de células tumorales (Jain y col., 2008). Además de su extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos, las AuNPs pueden utilizarse en la elaboración de partículas nanoestructuradas para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas, así como en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA, etc.) (Chen y col., 2008). Otro importante campo de aplicación de las AuNPs es la

industria de los alimentos, donde se las utiliza como parte integrante de nanocompuestos poliméricos. Estos se utilizan en la fabricación de envases con propiedades antimicrobianas o para incrementar la resistencia a la abrasión de los envases (Chaudhry y col., 2008). Asimismo, ya se han elaborado indicadores de tiempo-temperatura a partir de AuNPs (Robinson y Morrison, 2010).

### II.2.2.1.4. La plata

La plata (Ag) es un elemento químico de número atómico 47 situado en el grupo 1b de la tabla periódica de los elementos. Su símbolo es Ag (procede del latín: *argentum*). Es un metal de transición blanco, brillante, blando, dúctil y maleable. Se encuentra en la naturaleza formando parte de distintos minerales (generalmente en forma de sulfuro) o como plata libre. La mayor parte de su producción se obtiene como subproducto del tratamiento de las minas de cobre, zinc, plomo y oro. La plata ha sido ampliamente utilizada desde hace millones de años en la historia de la humanidad, en aplicaciones como la joyería, utensilios, fotografía, etc. (Chen y Schluesener, 2008). Incluso civilizaciones antiguas como los griegos utilizaban la plata para cocinar y mantener la seguridad del agua. Sus propiedades antimicrobianas ya se explotaban antiguamente con la medicina tradicional (Behera y col., 2011).

Las referencias a la plata como protectora contra las infecciones son continuas a lo largo de la historia, aunque no fue hasta 1893 cuando Karl Wilhelm von Nageli, botánico suizo, hizo pública la primera investigación demostrando las características antimicrobianas de la plata. La plata se introduce en el interior de las células de los microorganismos a través de unos transportadores de metales presentes en su membrana compitiendo con ellos por los lugares de captación. El mecanismo de acción de los iones de plata está estrechamente relacionado con su interacción con los grupos tiol (Furr y col., 1994). Los iones de plata actúan interfiriendo en la permeabilidad gaseosa de la membrana (respiración celular) y una vez en el interior de la célula, alteran su sistema enzimático, inhibiendo su metabolismo y producción de energía y modificando su material genético (Schreurs y Rosenberg, 1982; Thurman y Gerba, 1989). El microorganismo pierde rápidamente toda capacidad de crecer y reproducirse (Richards y col., 1984). De esta manera se evita el desarrollo de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Legionella*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, entre otros.

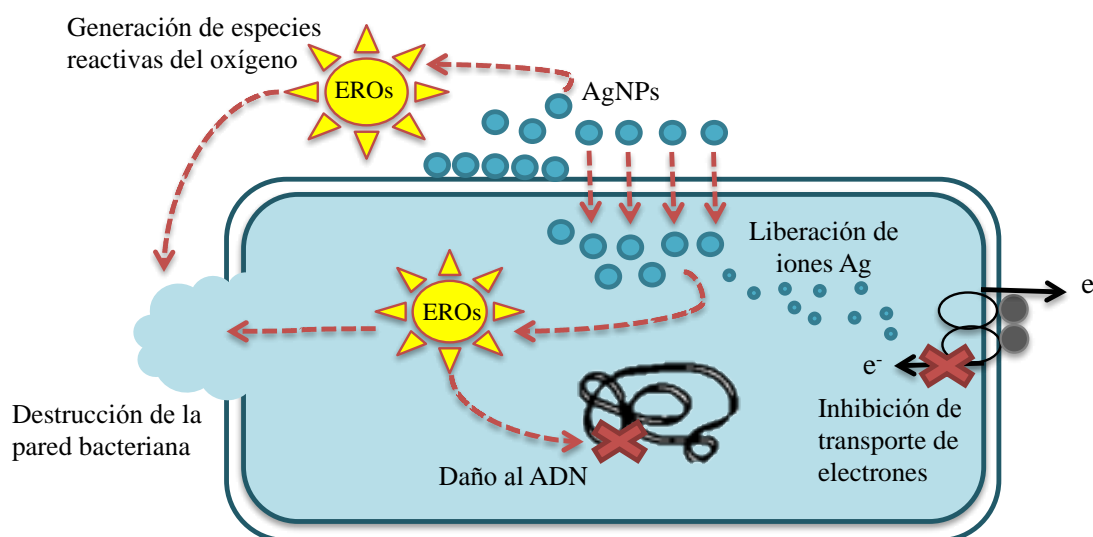
Una de las virtudes de la plata es que constituye un antimicrobiano de amplio espectro. La plata iónica destruye las bacterias, hongos, virus y protozoos, aunque es menos activa frente a microorganismos más resistentes, como las esporas. Además, los estudios revelan que es muy poco probable que los microorganismos desarrollen algún tipo de resistencia al tratamiento, ya que los iones de plata quedan atrapados en un sustrato matriz o film protector desde donde actúan (Brown y Smith, 1976). Sin embargo, la exposición a la plata está asociada con síntomas clínicos específicos, tales como la argiria, la cual causa una coloración grisácea de la piel (Payne y col., 1992). Se sabe que las áreas más expuestas a la luz solar (tales como la cara y las manos) experimentan una decoloración más pronunciada, sugiriendo que existe algún componente fotosensible (Wadhera y Fung, 2005). El origen de este fenómeno es incierto, pero se piensa que deriva de la estimulación de la plata a los melanocitos (Chang y col., 2006). No obstante, este fenómeno es reversible ya que con la finalización del tratamiento la coloración de la piel vuelve a ser normal. Por lo tanto, la duración y alcance de la exposición a la plata es crítico para el desarrollo de argiria (Johnston y col., 2010).

#### ***II.2.2.1.4.1. Nanopartículas de plata***

En los últimos años, la plata ha ganado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y actividad catalítica y antibacteriana. Por ello, las AgNPs se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la nanotecnología, según un informe de investigación de mercado realizado por Bourne research (<http://www.bournereseach.com>). Debido a su fuerte actividad antimicrobiana las AgNPs están siendo una alternativa en sustitución a los iones de plata. La formación de complejos de iones de plata es limitado y el efecto de los iones se mantiene de alguna manera sólo por un corto período (Méndez-Vilas, 2011). Sin embargo, este inconveniente se ha resuelto mediante la aplicación de las AgNPs, ya que presentan mayores propiedades antibacterianas mediante la inducción de la síntesis de especies reactivas del oxígeno (EROs) tales como peróxido de hidrógeno (Mohammed, 2015). La alta eficacia de las AgNPs se debe principalmente a la mayor relación de superficie-volumen para las interacciones, facilitando la penetración de las AgNPs en las células bacterianas, en comparación con los iones de tamaño micro de plata (Durán y col., 2010).

El mecanismo exacto de la actividad antibacteriana de las AgNPs aún no se ha determinado, la **Figura 9** muestra un resumen. Li y colaboradores (2008) han propuesto tres posibles mecanismos:

- El crecimiento y la proliferación bacteriana se inhiben por la adhesión de las AgNPs a la pared celular produciendo cambios en la misma.
- La captación de las AgNPs por la célula bacteriana conduce a daños en el ADN, o incluso la muerte celular, mediante la alteración del funcionamiento normal del ADN bacteriano.
- La interacción de AgNPs con las proteínas que contienen azufre presentes en la pared celular bacteriana causa irreversiblemente su destrucción.

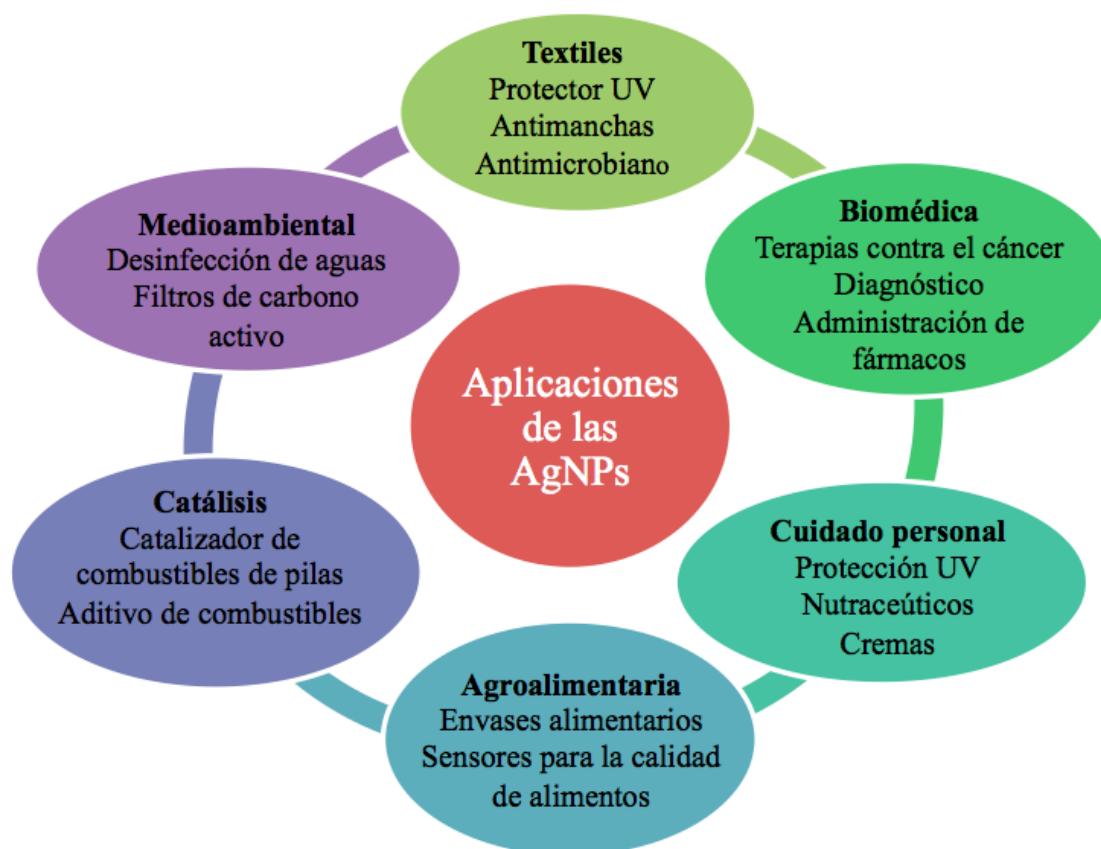


**Figura 9.** Posible mecanismo de actividad antibacteriana por las AgNPs.

Las AgNPs se pueden incorporar en una amplia gama de aplicaciones tales como agentes antisépticos en la industria médica, cosméticos, envases de alimentos, la bioingeniería, la electroquímica, la catálisis, y usos ambientales (**Figura 10**).

Debido a las diferentes actividades catalíticas de las AgNPs, estas son aplicadas como catalizadores en diversos tipos de procesos como por ejemplo, la descomposición de  $H_2O_2$  a oxígeno (Merga y col., 2007), la emisión de quimioluminiscencia de luminol- $H_2O_2$  y la reducción de colorantes por borohidruro de sodio ( $NaBH_4$ ) (Guo y col., 2008). En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos con AgNPs para evitar el crecimiento bacteriano.

(Cohen y col., 2007; Tran y col., 2013). Por sus propiedades plasmónicas, las AgNPs también pueden ser explotadas como biosensores para detectar diversas anomalías o enfermedades del ser humano, como por ejemplo células tumorales (Morley y col., 2007). Además, también se está evaluando la utilización de las AgNPs contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos (Panyman y col., 2003), como ocurre con el virus del VIH-1, ya que ha sido demostrado que el tratamiento *in vitro* con AgNPs interacciona con el virus e inhibe su capacidad para unirse a las células del huésped (Elechiguerra y col., 2005). En la vida diaria los consumidores pueden tener contacto con las AgNPs contenidas en aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas, pinturas para paredes y productos cosméticos para el tratamiento por ejemplo del acné (Zhang y Sun, 2007; Kokura y col., 2010). Las AgNPs también se emplean en la industria textil para la fabricación de prendas de vestir, ropa interior y calcetines (Lee y col., 2007). Su utilización en fibras sintéticas o naturales potencia la actividad iónica gracias a la mayor cantidad de iones plata que son liberados. El resultado es la obtención de rápidos efectos antimicrobianos ó antiolor (Chen y Chiang, 2008).



**Figura 10.** Aplicaciones de las AgNPs (Keat y col., 2015).



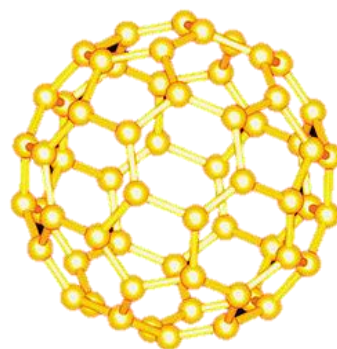
Finalmente, las AgNPs también tienen su aplicación en el sector alimentario, con su utilización en todas las etapas de la cadena alimentaria. Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto antifúngico que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. Estas NPs pueden aplicarse junto con un recubrimiento biodegradable en los frutos, mediante la inmersión de los mismos en la solución formadora de recubrimiento (Aguilar, 2009). Como aditivos alimentarios, las AgNPs se están desarrollando para ser utilizadas como conservantes para mejorar el sabor (Berekaa, 2015). Por último, una de sus principales aplicaciones en el sector alimentario es la fabricación de materiales en contacto con los alimentos, eliminando hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos en los alimentos (ObservatoryNANO, 2009), siendo una alternativa a otros métodos de conservación de alimentos que emplean la radiación, tratamiento térmico, almacenamiento a baja temperatura, o la introducción de aditivos antimicrobianos (Brody y col., 2008; Sekhon, 2010).

### II.2.2.2. Nanomateriales basados en carbono

Estos NMs están compuestos principalmente por carbono, generalmente formando esferas, elipses y tubos huecos. Tienen muchas aplicaciones potenciales, incluyendo películas mejoradas y recubrimientos, obteniendo materiales más fuertes y ligeros.

#### II. 2.2.2.1. Fullerenos

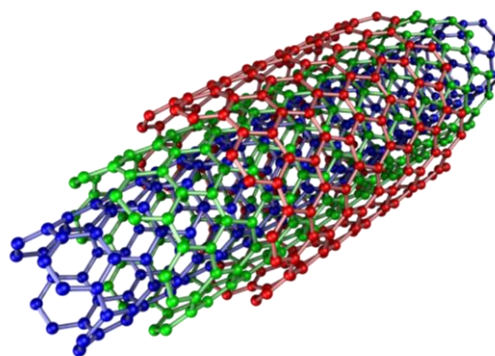
Los fullerenos son estructuras cerradas y huecas formadas por átomos de carbono dispuestos en forma de pentágonos y hexágonos, adoptando una estructura quasi-esférica (estrictamente un poliedro con un elevado número de caras) (**Figura 11**). Entre sus propiedades físicas destaca su alta resistencia a presiones extremas, recuperando su forma original cuando cesa la presión. Son muy prometedores en aplicaciones biomédicas, ya que tienen propiedades antioxidantes, además pueden ser una herramienta muy útil para la administración de fármacos a nivel celular, por su capacidad para ligarse a proteínas y moléculas más complicadas (González, 2011).



**Figura 11.** Fullerenos

#### II.2.2.2.2. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNTs) están constituidos por redes hexagonales de carbono curvadas y cerradas, formando tubos de carbono nanométricos con una serie de propiedades físicas de gran valor que fundamentan el interés que han despertado en numerosas aplicaciones tecnológicas (**Figura 12**). Son sistemas ligeros, huecos y porosos que tienen alta resistencia mecánica, y por tanto, interesantes para el reforzamiento estructural de materiales y formación de “composites” de bajo peso, alta resistencia a la tracción y enorme elasticidad. Electrónicamente, se ha comprobado que los nanotubos se comportan como hilos cuánticos con comportamiento aislante, semiconductor o metálico dependiendo de los parámetros geométricos de los tubos (Ricaud y Witschger, 2012).



**Figura 12.** Nanotubo de carbono

#### II.2.2.3. Dendrímeros

Consisten en polímeros de tamaño nano contruidos a partir de unidades ramificadas. La superficie de los dendrímeros tienen numerosos extremos de cadena, que pueden ser adaptados para realizar funciones químicas específicas. Existe una gran variedad de dendrímeros, y cada uno tiene propiedades biológicas tales como la polivalencia, interacciones electrostáticas, estabilidad química, baja citotoxicidad, y solubilidad. Estas características hacen que los dendrímeros sean una buena elección en el campo de la medicina, como por ejemplo para la administración de fármacos dentro de sus cavidades (Abbasi y col., 2014).

#### II.2.2.4. Nanocompuestos

Estos compuestos poseen NPs con otras NPs o con materiales más grandes. Un ejemplo son las nanoarcillas, las cuales se añaden a productos que van desde piezas de automóviles a materiales para el envasado, mejorando propiedades mecánicas, térmicas, barreras y retardantes de llama (Uddin, 2008).

### II.3. APLICACIONES DE LA NANOTECNOLOGÍA

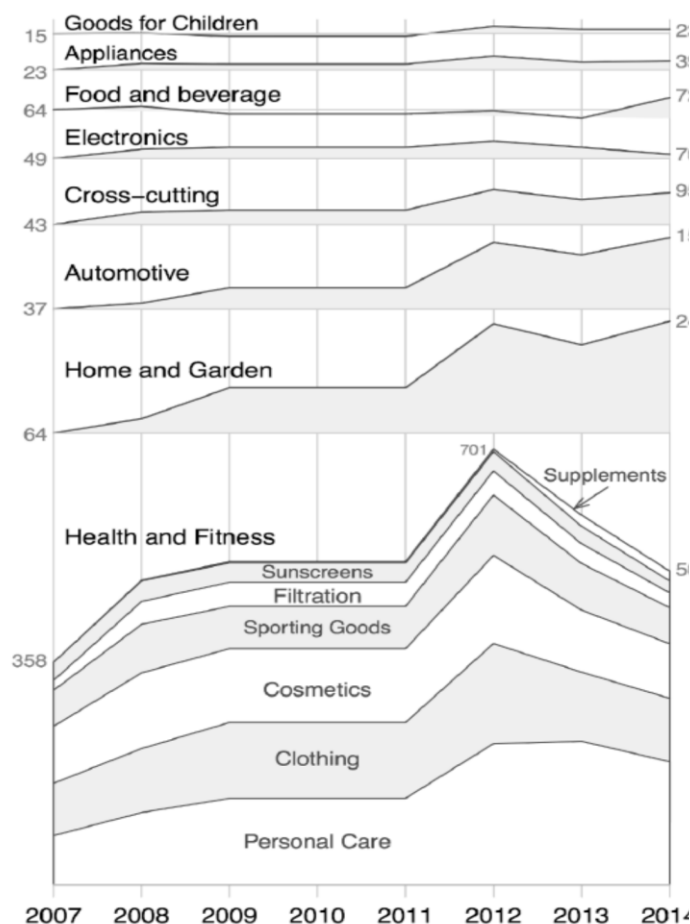
El interés de la nanotecnología radica en el hecho de que las propiedades exhibidas por los NMs son inmensamente diferentes a las que exhiben estos mismos materiales en una macroescala (Jos y col., 2009). Las NPs poseen una mayor relación de superficie-volumen y por tanto una mayor superficie de contacto con el entorno (Maurer-Jones y col., 2010). Por esta capacidad ventajosa que les otorga este distinto comportamiento, las NPs pueden formar parte de la composición de productos y aportarles nuevas propiedades. Así, se ha pasado en muy poco tiempo de una situación en la que prácticamente no existían NMs en nuestro entorno, a estar rodeados por una gran variedad de productos que los contienen en su composición. Sin embargo, esta diferencia de comportamiento puede igualmente inducir riesgos potenciales (Maurer-Jones y col., 2013).

La rápida evolución y crecimiento de la nanotecnología se ha convertido en una pieza clave para el fomento de la innovación competitiva, la aparición de nuevos negocios y perspectivas para muchos sistemas económicos. Representan una revolución de dispositivos con precisión atómica, a través del tratamiento de átomos y moléculas, teniendo aplicaciones en medicina y diversos tipos de industria como la automoción, textil, aeroespacial, informática y alimentaria entre otras (**Tabla 2**) (Ricaud y Witschger, 2012). En la actualidad, el inventario de productos para el consumo indica que hay 1814 productos que contienen NMs (Vance y col., 2015). Estos productos se agrupan bajo ocho grupos inspirados en los sistemas de clasificación de productos para el consumo (**Figura 13**) (Maynard y Michelson, 2006), siendo la categoría de salud y bienestar la mayoritaria (42% del total de los productos).

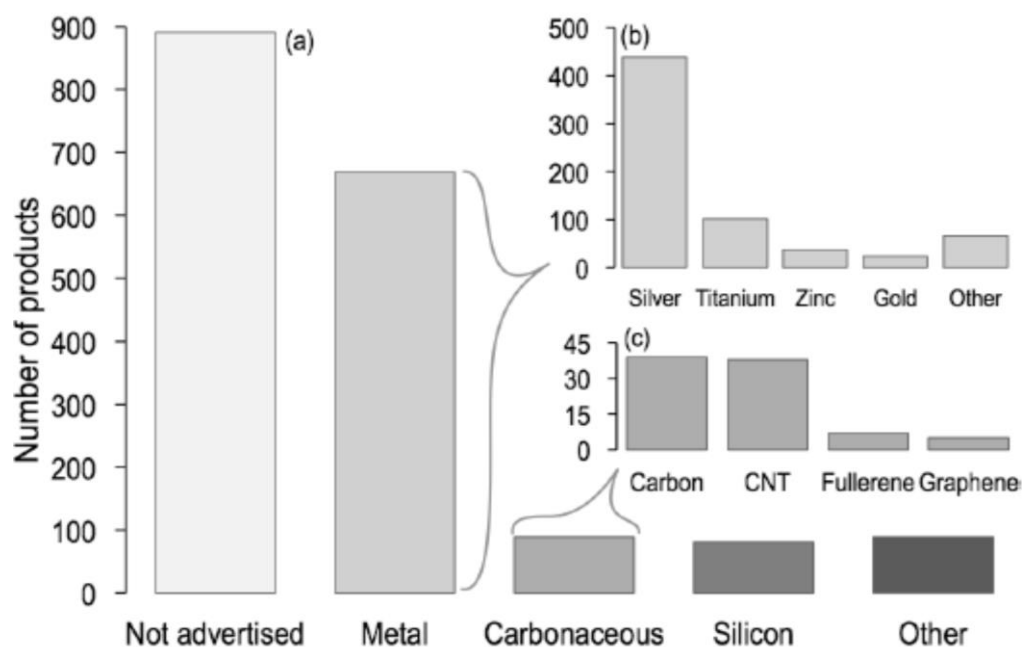
De los 1814 productos enumerados, el 47% (846 productos) de ellos anuncian la composición de al menos un componente nanomaterial. En dicho inventario hay 39 tipos diferentes de NMs que son agrupados en 5 categorías; metales, carbonosos, silicio, no informan del NM y otros (**Figura 14**). Los metales y los óxidos metálicos comprenden el mayor grupo de NMs con un 37% del total de los productos, de los cuales la plata es el principal.

**Tabla 2.** Aplicaciones de la nanotecnología por sector de actividad.

| Sector de Actividad                   | Ejemplos de aplicaciones actuales y potenciales   |
|---------------------------------------|---|
| Automóvil, aeronáutica y aeroespacial | Materiales reforzados y ligeros, pinturas con prestaciones especiales (color, resistencia física y química), sensores para la optimización del rendimiento de las motorizaciones, detectores de hielo en las alas de aeronaves, aditivos para diesel que permitan una mejora de la combustión, neumáticos de mayor durabilidad. |
| Electrónica y comunicaciones          | Memorias de alta densidad y procesadores miniaturizados, células solares, bibliotecas electrónicas de bolsillo, ordenadores y juegos electrónicos ultrarrápidos, pantallas planas.  |
| Agroalimentaria                       | Etiquetado y embalaje inteligente, aditivos, antiaglomerante, colorantes, emulsionantes.  |
| Química y materiales                  | Pigmentos, cargas, polvos cerámicos, inhibidores de la corrosión, catalizadores multifuncionales, textiles y revestimientos antibacterianos y ultrarresistentes.  |
| Construcción                          | Cementos autorreparables y antipolución, vidrios autolimpiables, pinturas, barnices, colas, masillas.   |
| Farmacia y salud                      | Medicamentos y agentes activos, superficies adhesivas médicas antialérgicas, medicamentos de liberación controlada en órganos específicos, superficies biocompatibles para implantes, vacunas orales, radiología.   |
| Cosmética                             | Cremas solares transparentes, pastas dentífricas abrasivas, maquillajes mejorados.  |
| Energía                               | Células fotovoltaicas de nueva generación, nuevos tipos de baterías, ventanas inteligentes, materiales aislantes de alta eficacia, almacenamiento de hidrógeno combustible.   |
| Medioambiente                         | Disminución de emisiones de CO <sub>2</sub> , producción de agua ultrapura a partir de agua marina, pesticidas y fertilizantes de alta efectividad y menos perjudiciales, analizadores químicos específicos.  |
| Defensa                               | Detectores de agentes químicos y biológicos, sistemas de vigilancia miniaturizada, sistemas de guía más precisos, textiles ultraligeros y autoreparables.   |
| Textil                                | Ropa de protección, textiles reforzados y fibras ignífugas.   |



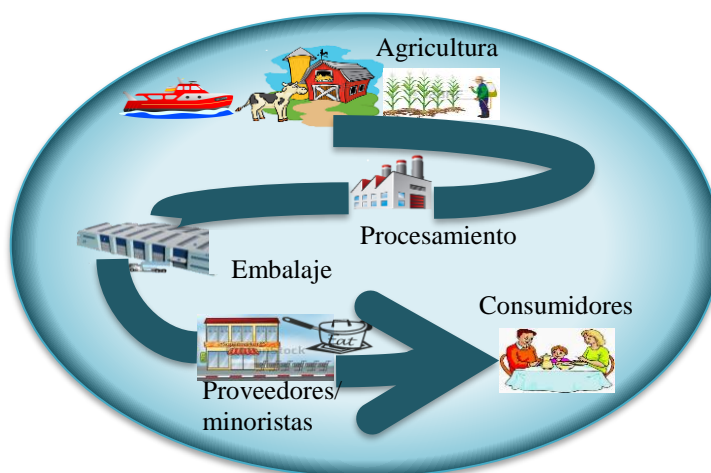
**Figura 13.** Número de productos con NMs disponibles en el tiempo en las diferentes categorías de productos de consumo (Vance y col., 2015).



**Figura 14.** (a) Composición de los NMs que figuran en el inventario agrupados en cinco categorías principales: no se anuncian, metal, NMs carbonosos, NMs basados en silicio y otros. (b) Composición elemental de los NMs que figuran en el categoría metales: plata, titanio, zinc, oro y otros metales. (c) NMs carbonosos (Vance y col., 2015).

### II.3.1. Aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria

La nanotecnología brinda grandes oportunidades para la obtención de productos y aplicaciones innovadoras en el sector agroalimentario. Estas aplicaciones se están estudiando, desarrollando e incluso utilizando en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos, como se ilustra en la **Figura 15**.

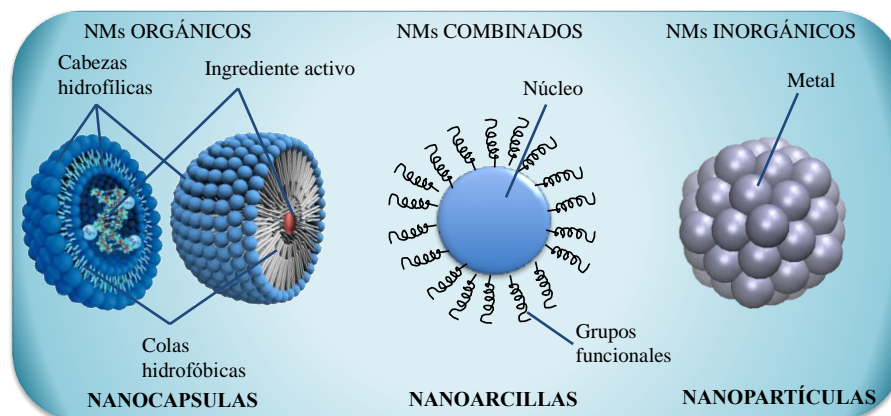


**Figura 15.** Cadena de producción de alimentos (RIKILT y JRC, 2014).

Generalmente, los NMs usados para la alimentación se dividen en 3 grupos; NMs orgánicos, NMs combinando orgánico/inorgánico (superficie modificada) y los NMs inorgánicos (**Figura 16**). La mayoría de las aplicaciones con NMs orgánicos se debe a la encapsulación de aditivos (vitaminas, antioxidantes, colorantes, etc.), y en menor medida a pesticidas y fármacos veterinarios. Estos nanoencapsulados consisten generalmente en micelas, liposomas o nanoesferas, y suelen ser considerados como materiales seguros (Peters y col., 2011). El principio fundamental en el que se basa la obtención de sustancias orgánicas de tamaño nanométrico es su mayor ingestión y absorción y la mejor biodisponibilidad en el organismo, en comparación con los homólogos ordinarios a escala micro o macroscópica. Los NMs combinados, también llamados NMs funcionalizados de superficie son NMs que añaden cierto tipo de funcionalidad a la matriz, como puede ser cierta actividad antimicrobiana. Un ejemplo de este material son las nanoarcillas, usadas para el desarrollo de envases alimentarios (Singla y col., 2012). Finalmente, los NMs inorgánicos constan de metales, principalmente NPs de metales oxidados cuya aplicación mayoritaria consiste en el desarrollo de envases de alimentos. Entre los metales más usados encontramos las NPs de plata, hierro, calcio y magnesio, selenio, dióxido de silicio y dióxido de titanio (Weir y col., 2012).

En la actualidad la mayoría de los NMs empleados en la industria agroalimentaria se basan en NMs orgánicos (nano-encapsulados), mientras que en el estudio y desarrollo de

nuevas aplicaciones los NMs inorgánicos (principalmente la plata) son los mayoritarios (RIKILT y JRC, 2014). Dentro de las aplicaciones en la industria agroalimentaria, los aditivos alimentarios y los materiales en contacto con los alimentos son los más utilizados.



**Figura 16.** Principales tipos de NMs usados para la alimentación y las aplicaciones relacionadas.

Los NMs son utilizados en la industria agroalimentaria para prevenir el deterioro microbiano de los alimentos envasados, para mejorar los colores, sabores y texturas y aumentar la biodisponibilidad de vitaminas y minerales. Además, la aplicación de NMs también ha permitido el desarrollo de materiales de embalaje innovadores que pueden mejorar la seguridad y la vida útil de los productos. Estas perspectivas han llevado a desarrollos innovadores en la agricultura, alimentación y sectores relacionados. La **Tabla 3** muestra diferentes ejemplos de futuras aplicaciones del uso de NMs en el sector agroalimentario (RIKILT y JRC, 2014).

### II.3.1.1. Producción agrícola

En referencia a la aplicación de la nanotecnología en la producción agrícola destacan la mejora de la productividad, optimizando el uso del agua, los fertilizantes y los productos fitosanitarios y la protección de los cultivos y el medio ambiente. En la actualidad solo unos pocos productos están comercializados, y la mayoría de las aplicaciones se encuentran en la etapa de desarrollo (Perlatti y col., 2012).

Una de las principales aplicaciones son los pesticidas, como por ejemplo el uso de nano-encapsulados para la liberación de pesticidas y otras sustancias químicas (Kah y col., 2012),

con la ventaja de controlar mejor su liberación en el medio ambiente y su movimiento. Es decir, los recubrimientos pueden permitir que las partículas no se adhieran a las plantas debido a su afinidad y así no se produzca la acumulación de esta sustancia tóxica en la planta. También la liberación del compuesto se produce más lentamente y por tanto no hay problemas de sobredosis temporal, minimizando la contaminación. Actualmente algunos de estos pesticidas ya están siendo aplicados, como por ejemplo, Nanocid® (Gholami-Ahangaran y Zia-Jahromi, 2013) y Quitosano (Cota-Arriola y col., 2013).

**Tabla 3.** Potenciales aplicaciones del uso de NMs en la industria agroalimentaria.

|  | <b>Campo de aplicación</b> | <b>Potenciales aplicaciones</b>   |
|--|----------------------------|---|
|  | Agricultura                | <ul style="list-style-type: none"> <li>✧ Nanocápsulas para una mayor eficiencia de distribución de pesticidas, fertilizantes y otros agroquímicos.</li> <li>✧ Nanomateriales para detección de plagas.</li> </ul>   |
|  | Alimentos y piensos        | <ul style="list-style-type: none"> <li>✧ Nanocápsulas para mejorar la dispersión, biodisponibilidad y absorción de nutrientes.</li> <li>✧ Nanomateriales como potenciadores de color.</li> <li>✧ Nano-encapsulado como potenciadores de sabor.</li> <li>✧ Nanotubos y nanopartículas como agentes de gelificación y viscosidad.</li> <li>✧ Nanopartículas para detección de patógenos de los alimentos.</li> </ul>      |
|  | Envases de alimentos       | <ul style="list-style-type: none"> <li>✧ Nanopartículas para detectar metabolitos de patógenos alimentarios.</li> <li>✧ Nanosensores biodegradables para monitorizar temperatura y humedad.</li> <li>✧ Nanoarcillas y nanofilms como materiales de barrera para prevenir el deterioro y la absorción de oxígeno.</li> <li>✧ Nanopartículas para recubrimientos superficiales antimicrobianos y antifúngicos.</li> </ul> |
|  | Suplementos alimentarios   | <ul style="list-style-type: none"> <li>✧ Suspensión de nanopartículas como antimicrobianos.</li> <li>✧ Nano-encapsulación para la entrega selectiva de nutraceuticos.</li> </ul>  |

Además, la nanotecnología no solo se estudia y se aplica para proteger los cultivos y productos alimenticios de plagas, sino que también se emplea para aumentar la producción y calidad de los cultivos (Kole y col., 2013; Wang y col., 2012). Fertilizantes en forma de nanoemulsiones se utilizan para aumentar la potencia de ingredientes activos o para reducir potencialmente la cantidad de fertilizante que debe ser aplicado (Barati, 2010). Otras de las aplicaciones de los NMs en la agricultura son la gestión de residuos agrarios (mediante nanofibras de algodón), el proceso de purificación del agua y la limpieza de suelos (FAO, 2010).



### ***II.3.1.2. Procesado de alimentos, aditivos y suplementos alimentarios***

En la actualidad, muchas empresas están invirtiendo en el estudio de la nanotecnología para lograr alimentos más saludables, nutritivos y de más sabor. Su principal uso en la alimentación es la incorporación de aditivos alimentarios. Entre los aditivos más empleados se encuentran:

El óxido de silicio (E551), principalmente usado en forma de precipitado con un tamaño primario entre 30 y 50 nm. Estas NPs de SiO<sub>2</sub> se unen mediante fuerzas de van der Waal's formando agregados con un tamaño de 100 nm a 100 µm. Este aditivo es usado como agente anti-aglomerante en productos alimenticios en polvo y en piensos de animales. Estudios recientes han observado que al menos una parte de este material se encuentra en un tamaño nano en los alimentos (Peters y col., 2012; Athinarayanan y col., 2014).

El óxido de titanio (E171), frecuentemente usado para mejorar el color blanco de ciertos alimentos, como los productos lácteos y dulces. Además, también es usado como aditivo alimentario para mejorar el sabor en una variedad de alimentos que no son blancos, incluyendo legumbres, nueces, semillas, mostaza, así como cerveza y vino. Al igual que con el silicio, las partículas se agregan con un tamaño medio de 200-300 nm, sin embargo se ha observado que hasta un 36% del óxido de titanio presente en productos alimenticios contiene partículas con un tamaño inferior a 100 nm (Weir y col., 2012).

Las nanoestructuras de hierro, como el óxido de hierro (E172), son útiles para enriquecer ciertos alimentos y compuestos con este metal, ya que la deficiencia de este micronutriente en la salud humana es una de las más comunes (Hilty y col., 2011).

Otros muchos metales en forma de NPs están también disponibles como aditivos alimentarios, entre los que se incluyen nano-selenio (Xu y col., 2007), nano-calcio (Hanning y Hanning, 2010) y suspensiones coloidales de partículas metálicas (cobre, oro, plata, platino, etc.) (Park y col., 2006).

A largo plazo, se prevé que el uso de la nanotecnología se dirija a la liberación controlada de ingredientes alimentarios o nutrientes encapsulados. La nano-encapsulación supone la incorporación, absorción o dispersión de compuestos bioactivos en o sobre

pequeñas vesículas a escala nano. La incorporación de estos biocompuestos puede proteger contra la degradación, mejorando la estabilidad y solubilidad y por tanto puede aumentar la biodisponibilidad y liberación a células y tejidos (Magnuson y col., 2011; Taylor y col., 2005). En el caso de las aplicaciones para la industria alimentaria, solo polímeros aptos para uso alimentario basados en lípidos, proteínas y polisacáridos pueden ser utilizados (Graveland-Bikker y de Kruif, 2006). De estos tres tipos, las NPs basadas en lípidos son de las NPs orgánicas más utilizadas ya que se pueden producir usando ingredientes naturales o a una escala industrial y tienen la habilidad de encapsular compuestos de diferentes solubilidades.

Además de aditivos y suplementos alimenticios, los NMs están siendo empleados en los recubrimientos de equipos de producción de alimentos. También se emplean NMs con propiedades antimicrobianas en los útiles de cocina como cacerolas, sartenes, vajillas, así como en los sistemas de filtrado de aire de algunos frigoríficos (Chen y col., 2010).

#### ***II.3.1.3. Materiales en contacto con alimentos***

Las aplicaciones de la nanotecnología en los materiales en contacto con los alimentos y en el envasado de alimentos constituyen el porcentaje más elevado del mercado actual y del previsto a corto plazo por lo que se refiere a las aplicaciones al sector alimentario (Chaudhry y col., 2008). Si bien, la mayor parte de las aplicaciones de la nanotecnología en los sectores agroalimentarios están actualmente en fase de investigación y desarrollo, o a punto de comercializarse, las aplicaciones en el envasado de alimentos se están convirtiendo rápidamente en una realidad comercial. Los factores que contribuyen a este desarrollo son los beneficios observados por lo que se refiere al peso ligero y a la resistencia del material, la duración de conservación prolongada de los alimentos envasados y la probabilidad de menos riesgos para los consumidores atribuibles al carácter fijo o adherido de los nanomateriales artificiales en los polímeros plásticos.

El uso de la nanotecnología en este área permite desarrollar nuevos materiales dotados de propiedades antimicrobianas, barreras gas/UV, láminas reforzadas mecánicamente y frente a la temperatura, etc. Todo esto permite, a su vez, reducir el espesor y peso de los materiales utilizados manteniendo, o mejorando, sus propiedades. También permite el desarrollo de barreras poliméricas más flexibles, más resistentes y de mayor transparencia óptica con

diversas aplicaciones (Wang y col., 2009a), así como el desarrollo de recubrimientos que repelen la suciedad, mediante el uso de superficies hidrófobas formadas por nanopirámides de cera que repelen el agua (Uriarte y Bald, 2008). Además, también se están desarrollando nanosensores biodegradables para controlar la temperatura y humedad y así hacer un seguimiento durante el transporte y almacenamiento de los alimentos envasados. Con respecto a los NMs más usuales, destacan las nanoarcillas y las NPs de plata.

Las nanoarcillas son usadas como capas impermeables en materiales de envasado, especialmente para botellas de plástico, ya que debido a su morfología en forma de plaquetas ofrece una resistencia mecánica, formando una barrera frente a los gases, componentes volátiles (como aromatizantes) o humedad. El principal mineral de las nanoarcillas es la montmorillonita, una arcilla natural obtenida de cenizas y piedras volcánicas (AESAN, 2009).

Las NPs de plata debido a sus propiedades antimicrobianas, son de las más usadas para el envasado de alimentos (De Azeredo, 2013). Se suelen utilizar de varias maneras, como por ejemplo en forma de partículas dispersas incrustadas en recipientes y recubrimientos (Martínez-Abad y col., 2012). Estos envases permiten que el alimento se mantenga durante más tiempo en óptimas condiciones para su consumo. Un ejemplo son los comercializados por la empresa DokDo Co, Ltd. ([www.centerforfoodsafety.org](http://www.centerforfoodsafety.org)).

### ***II.1.4.4. Productos comerciales con nanomateriales***

Muchas de las compañías de alimentos más grandes del mundo, incluidas Heinz, Nestlé, Unilever y Kraft, están explorando las posibilidades que ofrece la nanotecnología para el procesamiento y envasado de alimentos. La **Tabla 4** muestra algunos ejemplos de productos comerciales con NMs en la industria agroalimentaria.

## **II.4. RIESGOS TÓXICOS DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA SALUD Y EN EL MEDIO AMBIENTE**

### **II.4.1. Riesgos asociados a la nanotecnología**

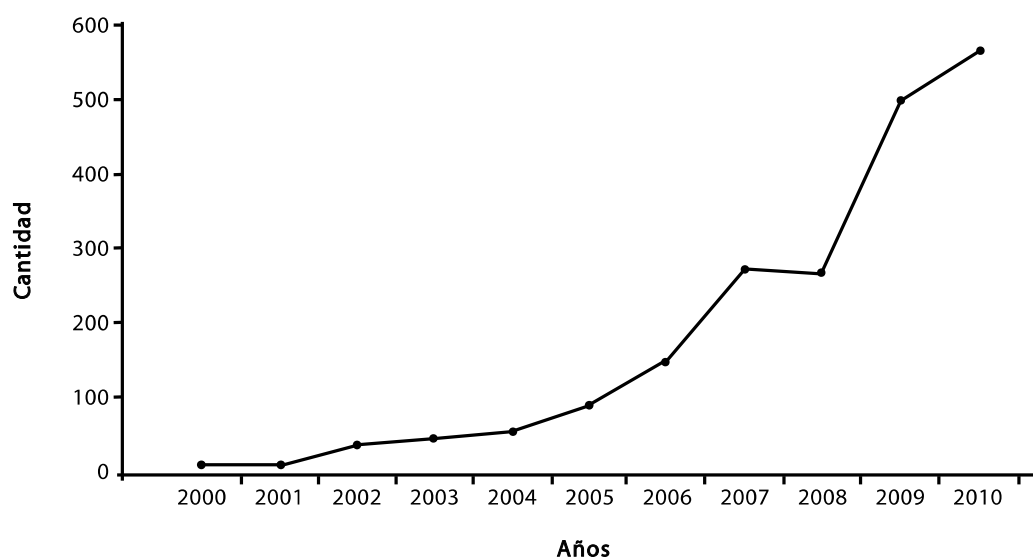
**Tabla 4.** Ejemplos de productos comercializados con NMs en la industria agroalimentaria (www.centerforfoodsafety.org).

|  | Nombre del producto                   | Subcategoría del producto | Empresa                     | País de origen | Nanomaterial                   | Forma/ Dimensión | Localización del nanomaterial |
|--|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------------|------------------|-------------------------------|
|  | Papel de aluminio de toppits          | Almacenamiento            | Melitta                     | Alemania       | Carbón                         | NPs              | Suspendido en un sólido       |
|  | Botella de cerveza de plástico        | Almacenamiento            | Voridian                    | EE.UU.         | Arcilla                        | Nd               | Suspendido en un sólido       |
|  | Frigorífico Daewoo®                   | Almacenamiento            | Daewoo                      | Korea          | Plata                          | NPs de 15-300 nm | En la superficie              |
|  | 24 horas Microactive® CoQ10           | Suplemento                | Genceutic Naturals          | EE.UU.         | Calcio y Magnesio              | Nd               | Suspendido en un sólido       |
|  | Aquanova® Novasol®                    | Suplemento                | Aquanova                    | Alemania       | Nano micelas                   | NPs de 30 nm     | Suspendido en un líquido      |
|  | MesoCopper®                           | Suplemento                | Purest Colloids, Inc.       | EE.UU.         | Cobre                          | NPs de 20 nm     | Suspendido en un líquido      |
|  | MesoGold®                             | Suplemento                | Colloids for life LLC       | EE.UU.         | Oro                            | NPs de 0.65 nm   | Suspendido en un líquido      |
|  | LifePak® Nano                         | Suplemento                | Pharmanex                   | EE.UU.         | Cobre, silicio y óxido de zinc | NPs              | Suspendido en un líquido      |
|  | Tabla de cortar Nano-Silver           | Cocina                    | Pro-Idee GmbH & Co. KG      | Alemania       | Plata                          | NPs              | En la superficie              |
|  | Utensilios de cocina anti-bacterianos | Cocina                    | Nano Care Technology, Ltd.. | China          | Plata                          | NPs              | Nd                            |
|  | Aceite de canola activo               | Aditivo                   | Shemen Industries           | Israel         | Nano micelas                   | NPs              | Suspendido en un líquido      |
|  | m&m's                                 | Aditivo                   | Mars                        | EE.UU.         | TiO <sub>2</sub>               | NPs              | Suspendidas en un sólido      |
|  | Old el Paso Taco Seasoning Mix        | Aditivo                   | General Mills               | EE.UU.         | SiO <sub>2</sub>               | NPs              | Polvo                         |

En virtud de las numerosas aplicaciones de los NMs, debemos asumir que la exposición humana a éstos, aumentará de forma sustancial en los próximos años, pudiendo tener

repercusiones para la salud y el medio ambiente (Aschberger y col., 2011). En este contexto nace la “Nanotoxicología”, una disciplina emergente dentro del ámbito toxicológico, que evoluciona del conocimiento obtenido de la toxicidad de las partículas ultrafinas y cuyo objetivo es con el estudio de la seguridad y los riesgos potenciales para la salud producidos por los NMs y los dispositivos o sistemas de dimensión en la nanoescala (Singh y col., 2009).

El término “Nanotoxicología” fue utilizado por primera vez en 2004 en un editorial de Donaldson y col. (2004). Algunos miembros de la Sociedad de Toxicología formaron una sección especializada titulada “Nanotoxicología” en 2007 y la revista llamada “Nanotoxicología” fue lanzada en el mismo año. Desde este momento, ha habido una explosión en la investigación toxicológica nano tanto *in vitro* como *in vivo* (Warheit y col., 2007; Gopee y col., 2007; Shvedova y col., 2008; Baker y col., 2008; Muller y col., 2009; Robbens y col., 2010; Sayes y col., 2010; Porter y col., 2010). El Consejo Internacional de Nanotecnología (ICON), una institución de la Universidad de Rice (Estados Unidos) que investiga sobre riesgos de los NMs, tiene una base de datos al respecto. De 2000 a 2010 esta base de datos registró un aumento sostenido de artículos publicados en revistas científicas dedicados a analizar los potenciales riesgos de los NMs en la salud humana y/o en el medio ambiente (**Figura 17**) (Foladori y col., 2013).



**Figura 17.** Evolución de la cantidad de artículos científicos sobre riesgos de los NMs en la salud y/o en el medio ambiente 2000-2010.

Las nuevas propiedades fisicoquímicas que presentan los NMs debido, principalmente a su pequeño tamaño, hacen que no sea posible inferir su toxicocinética y perfil de toxicidad por extrapolación a partir de datos de sus equivalentes no nanoestructurados (EFSA Comité Científico, 2011a). Su estudio, que se encuentra en desarrollo, es imprescindible para una correcta evaluación del riesgo, dadas las múltiples incertidumbres existentes como por ejemplo la caracterización de los NMs, realización de ensayos de toxicidad a largo plazo, métodos de determinación, datos reales de exposición humana y de animales, etiquetado que informe al consumidor de su presencia en alimentos, etc.

La evaluación de los potenciales riesgos de la nanotecnología para los consumidores mediante el modelo convencional (**Figura 18**): identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo, se considera aceptable según diversos informes de expertos y Comités (SCENIHR, 2007; SCPP, 2007; FDA, 2007; FSAI, 2008). El Comité Científico de la EFSA considera que el proceso de evaluación de riesgos potenciales de los NMs específicos se encuentra en fase de desarrollo y que deben tenerse en cuenta propiedades específicas de los NMs.



**Figura 18.** Fases de la evaluación del riesgo

La EFSA publicó en 2011 una “Guía para evaluar el riesgo de la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología en alimentos y en la cadena alimentaria” (EFSA Comité Científico, 2011a), proporcionando un enfoque práctico para evaluar los riesgos potenciales derivados de las aplicaciones de la nanociencia y la nanotecnología en aditivos alimentarios,

enzimas, aromatizantes, materiales en contacto con los alimentos, nuevos alimentos, aditivos de piensos y pesticidas. En ella se facilita una orientación sobre los métodos de caracterización físico-química y métodos *in vivo* e *in vitro* para identificar y caracterizar los peligros derivados de las propiedades nano.

Para determinar la inocuidad/peligrosidad de los NMs, así como sus diferentes usos en alimentación humana y animal, se recomienda que los NMs se analicen atendiendo a los 5 estados en los que nos los podemos encontrar: estado originario (de fabricación), el de comercialización para uso en alimentación, el estado en el que se podría encontrar en los alimentos y en el estado que podría encontrarse en los tejidos y fluidos biológicos, una vez ingerido. El riesgo que pudieran ocasionar, es valorado en función de su composición química, características físico-químicas, su capacidad de interacción con los tejidos y los niveles de exposición posibles, es decir, la cantidad de NMs a la que se podría exponer teóricamente la población.

Antes de la comercialización para su uso en alimentación su posible riesgo debe ser evaluado en cada uno de los escenarios posibles y se deben acometer estudios *in vivo* e *in vitro* para obtener la dosis respuesta que ayude a definir los límites que no habría que rebasar para que los NMs sean inocuos. Sin embargo, la Guía de la EFSA, al igual que otras de la UE, no son parte de la legislación y por tanto no es jurídicamente vinculante.

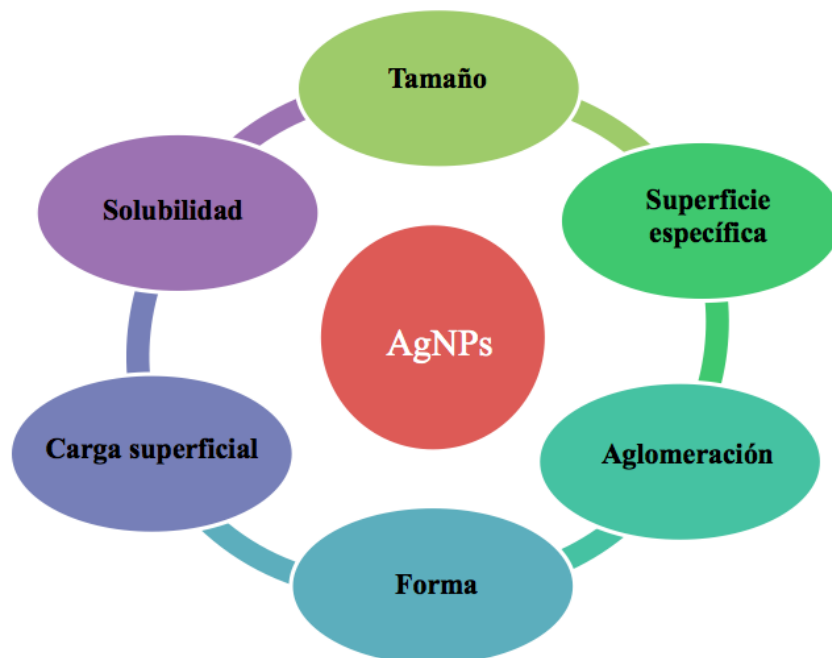
### **II.4.1.1. Factores que afectan a la toxicidad intrínseca de los nanomateriales**

Además del pequeño tamaño, principal característica de los NMs, otros parámetros físico-químicos son importantes para determinar las propiedades y los posibles efectos biológicos de los NMs (por ejemplo, la forma, la solubilidad y la carga y reactividad superficial) (**Figura 19**) (Nel y col., 2009; Rivera y col., 2010; SCENIHR, 2010).

#### **II.4.1.1.1. Factores químicos**

- *Composición química.* Uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de determinar la toxicidad de un NM es su composición química. En general, cuanto más tóxico sea el material en la escala no nano, mayor será también su toxicidad a tamaño nanométrico. Además, la presencia de otros compuestos químicos adheridos a la superficie, tales como

impurezas de síntesis (hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales de transición), puede afectar a la toxicidad. En este sentido, los metales de transición intervienen en la formación de EROs que tienen un papel esencial en los procesos de inflamación (Gálvez y Tanarro, 2010).



**Figura 19.** Principales factores físico-químicos que afectan a la toxicidad intrínseca de las AgNPs.

- *Solubilidad.* La solubilidad en fluidos biológicos (diferentes pH, o presencia de sales) es el segundo factor químico en orden de importancia en la evaluación toxicológica de los NMs. Cuando las NPs se disuelven pierden su estructura de NPs y las propiedades toxicológicas específicas de estas, siguiendo entonces consideraciones toxicológicas similares a las de otro contaminante con efectos sistémicos. Las NPs insolubles o poco solubles en los fluidos biológicos mantendrán las características toxicológicas relacionadas con su forma nano. Por este motivo, las partículas insolubles o poco solubles serán de mayor peligrosidad (INSHT, 2015).

- *Carga superficial.* Las propiedades ácido-base y el potencial redox del conjunto de átomos de superficie y su interrelación, definen el nivel de carga y energía superficial de las NPs, así como el comportamiento reactivo de las mismas. Existen estudios donde se ha observado una correlación directa entre la carga superficial y la toxicidad de las NPs. El Badawy y col. (2011) observaron que las AgNPs estabilizadas con citrato con cargas



superficiales negativas fueron menos citotóxicas que las AgNPs con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilenimina ramificada.

### II.4.1.1.2. Factores físicos

- *Tamaño y superficie específica.* El reducido tamaño de las NPs es un factor crítico en la evaluación toxicológica. Muchas publicaciones han mostrado que la toxicidad de las NPs depende del tamaño (Kim y col., 2012; Kumar y col., 2015). Además, el tamaño de las NPs también influye en la distribución tisular (De Jong y col., 2008), en la penetración dermal e intestinal (Sonavane y col., 2008) y en la captación celular (Chithrani y col., 2006). En general, mayores efectos tóxicos han sido observados con las NPs más pequeñas.

El tamaño y la superficie específica de las NPs están en estrecha relación, ya que conforme disminuye el tamaño de las NPs la superficie específica aumenta dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie, que estarán disponibles para las reacciones redox, reacciones fotoquímicas y para interacciones físico-químicas con las células. Además, también puede fomentar la disolución de los materiales, y por tanto dar lugar a liberación de iones, que pueden ser potencialmente tóxicos (Kittler y col., 2010; Asharani y col., 2009).

- *Estado de aglomeración y agregación.* La estabilidad de las NPs también influye en la toxicidad de estas. Las NPs tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados (Oberdörster y col., 2005). Los aglomerados son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo van der Waals, electroestáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos. Mientras que los agregados son grupos de partículas fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil. Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las NPs en el organismo, ya que un agregado o aglomerado de NPs se deposita en unas zonas u otras debido al distinto diámetro hidrodinámico. Además, también modifica la toxicidad, ya que al ser una estructura relativamente compacta, el área superficial es menor y por tanto la toxicidad también será menor (Gálvez y Tanarro, 2010).

- *Forma.* Se ha comprobado que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y por tanto son más reactivas (Pal y col., 2007). Siendo las esféricas las que presentan menor toxicidad. Además, se

necesita disponer de información sobre la forma en que el material se ingiere, se absorbe y permanece, ya que si bien los NMs suelen encontrarse de forma aglomerada en los alimentos, dichos aglomerados pueden romperse en el propio alimento, el tracto gastrointestinal (GI) y los tejidos biológicos, además de interactuar con biomoléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc.).

La primera etapa para una correcta evaluación del riesgo de los NMs es disponer de una adecuada identificación y caracterización de los NMs (EFSA Comité Científico, 2011a). Esto es muy importante ya que como hemos mencionado, NMs de la misma composición química pero diferentes tamaños y formas pueden presentar diferentes toxicidades, y en definitiva, influir en el resultado de evaluación del riesgo. Por tanto, es importantísimo realizar una caracterización detallada de cada una de las NPs antes de realizar cualquier otro ensayo de toxicidad, con el fin de entender las influencias celulares exactas de cada una de ellas, además de comprender y controlar la síntesis y las aplicaciones de las NPs. Para ello, es imprescindible desarrollar metodologías analíticas adecuadas para la detección y cuantificación de los NMs. La selección de un método óptimo para medir los parámetros fisicoquímicos dependerá del tipo de NM, y del entorno de medición (p.e. si es un líquido, una matriz alimentaria o un envase alimentario). Por ejemplo, la caracterización química de un NM metálico necesitará un método analítico diferente comparado con un encapsulado orgánico. Por lo tanto, la elección del método y los parámetros a medir se deben elegir caso por caso (EFSA Comité Científico, 2011a).

Se dispone de métodos para la detección y caracterización de NMs que generalmente consisten en la combinación de varias técnicas. Principalmente se pueden observar tres categorías: técnicas de imagen, de separación y espectroscópicas (**Tabla 5**) (Bouwmeester y col., 2014).

Dentro de las técnicas por imagen, el microscopio electrónico de transmisión (MET) es usado para determinar el tamaño del núcleo metálico, el microscopio de fuerza atómica (MFA), para medir el tamaño de la NP y su distribución, la dispersión de luz dinámica (DLS) para determinar el radio hidrodinámico, esto es, el tamaño de la NP, núcleo + corona + capa de disolvente y por último el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) usado para obtener la distribución de tamaño y la concentración de las NPs (Choi y col., 2007; Yoosaf y col., 2007; Bouwmeester y col., 2014). La cromatografía hidrodinámica (HDC), el

fraccionamiento campo-flujo (FFF) y la dispersión de luz de ángulo múltiple (MALS) son técnicas de separación que determinan el tamaño de las NPs por fraccionamiento (HDC y FFF) y el peso molecular de los NMs (MALS) (Bouwmeester y col., 2014). La composición de las NPs se puede determinar utilizando la espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) la cual mide el estado de oxidación del elemento metálico, por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) que determina el peso atómico del elemento y su cantidad relativa y por último por espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y espectrometría de absorción atómica (FAAS), ambas determinan la concentración de metal. Otras técnicas que también se podrían emplear para la caracterización de las NPs son la espectrometría de infrarrojo (IR) y la espectrometría de ultra violeta (UV), entre otras (Anghel y col., 2013; Liu y col., 2013).

**Tabla 5.** Técnicas para la detección y caracterización de NMs en alimentos, piensos y otras muestras biológicas.

| Categoría      | Técnicas  |
|----------------|---|
| Imagen         | <ul style="list-style-type: none"><li>✧ Microscopio electrónico de transmisión (TEM).</li><li>✧ Microscopio de fuerza atómica (AFM).</li><li>✧ Dispersión de luz dinámica (DLS).</li><li>✧ Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).</li></ul>   |
| Separación     | <ul style="list-style-type: none"><li>✧ Cromatografía hidrodinámica (HDC).</li><li>✧ Fraccionamiento campo-flujo (FFF).</li><li>✧ Dispersión de luz de ángulo múltiple (MALS).</li></ul>  |
| Espectroscopía | <ul style="list-style-type: none"><li>✧ Espectrometría de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).</li><li>✧ Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX).</li><li>✧ Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).</li><li>✧ Espectrometría de absorción atómica (FAAS).</li></ul> |

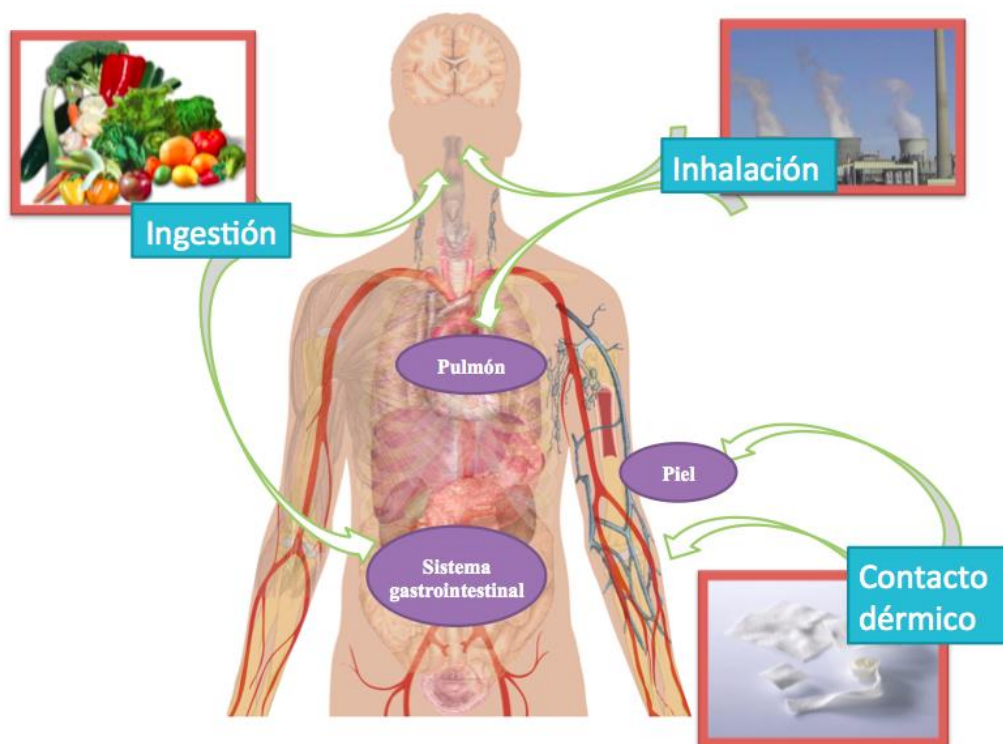
### II.4.1.2. Exposición a los nanomateriales

En vista de las diversas aplicaciones de las AgNPs, la exposición humana a las mismas puede tener lugar a través de los alimentos, el aire y por contacto (**Figura 20**), por lo que las vías de exposición oral, respiratoria y dérmica son las más relevantes (Johnston y col., 2010).

Otra vía de exposición que está aumentando en importancia es a través del tracto genital femenino, ya que están incorporando AgNPs en productos de higiene materna (Zhang y Sun, 2007).

#### II.4.1.2.1. Vía inhalatoria

El sistema respiratorio es la principal vía de entrada para las partículas ambientales. La inhalación de las NPs, está asociada con efectos pulmonares y cardiovasculares adversos (Pope y Dockery, 2006).

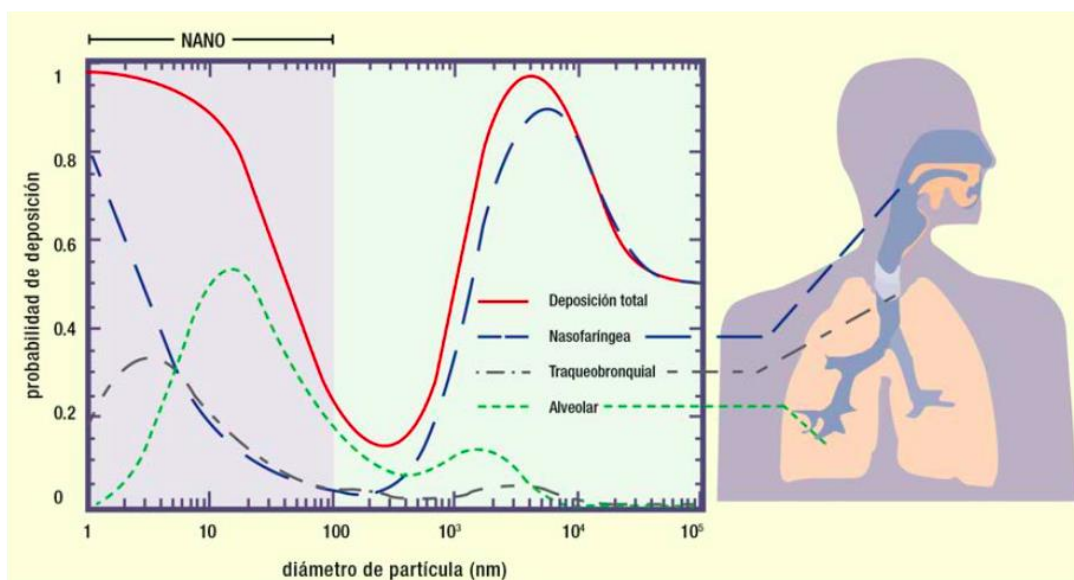


**Figura 20.** Principales vías de exposición de las NPs.

La deposición de las NPs en las vías respiratorias dependerá principalmente del diámetro aerodinámico de las mismas, el cual depende en gran medida del estado de agregación y aglomeración (Galvéz y Tanarro, 2010; Warheit y col., 2007). En función del tamaño las NPs podrán depositarse en el sistema respiratorio o ser directamente exhaladas. Normalmente se definen tres zonas de depósito de NPs en el sistema respiratorio (**Figura 21**):

- Nasofaríngea o extratorácica (nariz, boca, laringe y faringe).
- Traqueobronquial (tráquea y bronquios).
- Alveolar (alveolos y bronquiolos).

Las partículas que se depositan en una de las tres regiones del tracto respiratorio se distribuyen según su tamaño. Por ejemplo, el 90% de las partículas de 1 nm de tamaño se depositan en la región nasofaríngea, mientras que únicamente el 10% de las mismas se depositan en la región traqueobronquial y prácticamente ninguna en la alveolar. Por otro lado las NPs de 5 nm de tamaño se depositan casi en las mismas proporciones en las tres zonas de depósito, en cambio las partículas de 20 nm se depositan en un mayor porcentaje en la zona alveolar, mientras que en las otras regiones se depositan apenas en un 15% (Ostiguy y col., 2006). Estas NPs depositadas provocan una respuesta inflamatoria, ya que la fagocitosis de las NPs puede conducir a la activación de macrófagos alveolares y la liberación de quimiocinas, citoquinas, EROs y otros mediadores que originan como resultado una continua inflamación (Sung y col., 2009).



**Figura 21.** Deposición teórica total en el pulmón en función del diámetro de partículas. (UNE-ISO/TR 12885:2010 IN).

### II.4.1.2.2. Vía oral

Otra de las potenciales vías de entrada de nanocompuestos en el organismo es la vía oral por medio de la ingestión. Esta puede ocurrir de manera accidental, por el manejo de estas partículas al pasar de las manos a la boca por una falta de higiene o también puede acompañar a la exposición por inhalación, debido a la deglución de NPs retenidas en las vías altas del sistema respiratorio a través del sistema mucociliar. Así mismo, los NMs pueden llegar al sistema digestivo a través del agua, comida, cosméticos y medicamentos.

Varios estudios han investigado la absorción intestinal potencial y de translocación de las NPs y ésta tiene lugar principalmente en el tracto gastrointestinal (Houdy y col., 2011). Las NPs administradas oralmente son usualmente absorbidas a través de las células epiteliales de las placas de Peyers del tejido linfoide intestinal y también a través de los enterocitos intestinales (Ragnarsson y col., 2008). Por otro lado, nuevos estudios indican que la administración oral de NPs puede ser absorbida por el tracto digestivo y a través de los nódulos linfáticos alcanzar el hígado y el bazo. Se sugiere que los macrófagos contenidos dentro del sistema reticuloendotelial, son los principales responsables de eliminar las NPs de la circulación (Johnston y col., 2010).

La ingestión de partículas de plata en suspensión está asociada con una serie de consecuencias perjudiciales, incluyendo úlceras intestinales y argiria (Wadhera y Fung, 2005). Luoma (Luoma, 2008), sugirió que tras la ingestión de la plata es probable que se convierta en su forma iónica debido al pH ácido del estómago. Debido a la mayor área superficial de las nanopartículas, esto podría ocurrir también con las AgNPs. Además, la captación también puede tener lugar transcelularmente a través de los enterocitos o a través de vías paracelulares (Jani y col., 1990). Varias investigaciones sugieren que tras la exposición oral de las AgNPs, es probable que las AgNPs ó los iones plata se trasladen desde el intestino al torrente sanguíneo, por tanto pasen a la vía sistémica y a partir de ahí causen síntomas como la argiria y consecuencias perjudiciales como daño en el hígado. Además también se han observado depósitos de AgNPs en los riñones, cerebro, pulmones y testículos (Kim y col., 2009; Van der Zande y col., 2012). A pesar de estas investigaciones, se requieren más estudios para esclarecer la toxicocinética de estas AgNPs.

#### ***II.4.1.2.3. Vía dérmica***

Otra de las principales vías de entrada potencial de NPs en el organismo es la vía dérmica, es decir, la absorción de las partículas a través de la piel. Los factores a considerar son la zona y las condiciones de la piel expuesta así como las propiedades fisicoquímicas de los NMs. Algunos estudios muestran que partículas de tamaño igual o inferior a 40 nm pueden penetrar el estrato córneo de una piel íntegra. Por otra parte, las partículas de forma esférica tienen mayor capacidad de penetración que las de forma elíptica (Gautam y col., 2011). Las NPs liposolubles pueden transitar por el espacio intercelular de la capa córnea de

la piel y pasar a través de las células, de los folículos capilares o de las glándulas sudoríparas (Monteiro-Riviere e Inman, 2006).

La penetración transdermal de NPs a través de la piel intacta ha sido documentada (Tinkle y col., 2003). La permeabilidad de las NPs dentro de la piel normal puede estar influida por su habilidad para acceder a capas más profundas de la piel a través de folículos pilosos o conductos de sudor, donde la función barrera de la piel está alterada y es más débil (Hoet y col., 2004). Los poros, la irritación local (rascado, eczema, entre otros), las lesiones inflamatorias o traumáticas además de la flexión repetida de la piel son también factores que pueden favorecer la penetración dérmica de NPs (Gálvez y Tanarro, 2010). Las NPs pueden ser fagocitadas por los queratinocitos epidérmicos desencadenando una respuesta inflamatoria (Monteiro-Riviere y col., 2005). Además se ha observado un aumento de enzimas hepáticas que sugiere que el hígado ha sido dañado como consecuencia de un tratamiento con AgNPs. Este hecho pone en evidencia la disponibilidad de las NPs en la vía sistémica después del contacto dermal (Trop y col., 2006). Por tanto, es probable que la exposición de NPs en la piel dañada permita el acceso de estas y a través de los capilares dermales a la circulación sanguínea y así ejercer su toxicidad en sitios distales, ya que la estructura y la función del estrato córneo está comprometida.

### **II.4.1.2.4. Otras vías**

La exposición humana a NPs también puede ocurrir a través de inyecciones intravenosas, como por ejemplo en la liberación y/o direccionamiento de fármacos. Se ha observado que las AgNPs interaccionan con las células endoteliales de diferentes maneras. A bajas concentraciones actúan como factores antiproliferativos/ vasoconstrictores que perjudican la producción de óxido nítrico (NO), sin embargo, a dosis altas estimulan la proliferación/ vasorrelajación mediada por NO, por lo que los niveles de exposición de las NPs juegan un papel significativo en la toxicidad y puede tener otro impacto fisicoquímico. Además, las NPs también pueden tener acceso al sistema reproductivo a través de una variedad de productos comerciales como dispositivos anticonceptivos y productos de higiene femenina. Existen muy pocos estudios sobre los efectos de las NPs en el tracto reproductivo. Braydich-Stolle y col. (2005) mostraron que las AgNPs causaban toxicidad en las células madre de líneas germinales *in vitro*. Este hecho es importante porque las AgNPs pueden acceder a los espermatozoides humanos y podrían causar problemas en la fertilidad. Sin embargo, se

requiere una amplia investigación en la cinética de absorción y distribución así como en la progresión de la toxicidad de las NPs expuestas a través de la vía reproductiva.

Los principios de evaluación de la exposición de los NMs son los mismos que los de los materiales no nano-estructurados (EFSA, 2009). La **Tabla 6** muestra los parámetros que podrían ser identificados como relevantes para la evaluación de la exposición de los productos de consumo (Danish Ministry of the Environment, 2015). Los parámetros cualitativos son principalmente para caracterizar el escenario de exposición de un producto, mientras que los parámetros cuantitativos se pueden utilizar en un algoritmo para obtener una estimación cuantitativa de la exposición. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que en la actualidad muchos de los productos comercializados con NMs no indican las características necesarias (por ejemplo, tamaño de NPs, concentración, etc.) para una correcta evaluación de la exposición.

Existen diferentes herramientas para evaluar la exposición de los NMs (ECETOC TRA, NanoRiskCat), sin embargo, en la actualidad no es posible determinar los NMs en la matriz del alimento o el pienso mediante un análisis de rutina. La tendencia a la agregación de los NMs en el medio biológico es una complicación que hace casi imposible medir el número de partículas o el área superficial y por tanto estimar las dosis reales de exposición (FSAI, 2008). Por otro lado, los NMs pueden modificarse en la cadena de producción del alimento o pienso y durante su procesado o almacenamiento, debido a sus interacciones con las proteínas, lípidos y otras sustancias presentes en la matriz del mismo. Además, para la evaluación de la exposición, hay que considerar también los posibles efectos de la digestión u otras causas de degradación de la matriz de los NMs. Todas estas limitaciones indican las dificultades que presenta la evaluación de la exposición de los NMs en la industria agroalimentaria.

#### ***II.4.1.3. Toxicidad de los nanomateriales***

Estudios *in vivo* e *in vitro* recientes han evaluado los efectos de los NMs sobre diversos sistemas biológicos, proporcionando datos de gran utilidad para poder comprender las implicaciones que para la salud supone la exposición a estos materiales.



**Tabla 6.** Principales parámetros cualitativos y cuantitativos para determinar la exposición de los NMs.

| Parámetros de exposición cualitativos  | Parámetros de exposición cuantitativos  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Identificación del nanomaterial</li> <li>❖ Categoría del producto</li> <li>❖ Tipo de producto</li> <li>❖ Volumen / diseño del paquete del producto</li> <li>❖ Matriz para el nanomaterial</li> <li>❖ Uso del producto/ manipulación del producto durante su uso/ aplicaciones o procesos involucrados</li> <li>❖ Consideraciones sobre el mal uso previsible</li> <li>❖ Superficie corporal expuesta</li> <li>❖ Identificación de las vías de exposición específicas (vías de exposición primaria y secundaria)</li> <li>❖ El uso directo / indirecto (destinado a la exposición humana o no)</li> <li>❖ Generación de nanomaterial durante su uso (exposición especialmente inhalación)</li> <li>❖ Grupos específicos (niños, adolescentes, hombres adultos, mujeres adultas, etc.)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Concentración de nanomaterial en el producto</li> <li>❖ Volumen utilizado</li> <li>❖ Tasa de retención del producto (por ejemplo, fracción ingerida)</li> <li>❖ Grado de liberación / migración del nanomaterial desde la matriz</li> <li>❖ Área superficial del producto en contacto</li> <li>❖ Duración de la exposición</li> <li>❖ Frecuencia de la exposición</li> </ul> |

La idoneidad de los estudios de toxicidad *in vivo* con respecto a los NMs, fue discutida y aceptada, bajo determinados requerimientos relacionados con la nanoescala, por el Comité Científico de Riesgos Emergentes y de Nueva Identificación sobre la Salud (SCENIHR, 2009). Mediante estudios *in vivo* se pueden evaluar los posibles efectos tóxicos de mayor relevancia, tanto a nivel pulmonar como cardiovascular, atendiendo a efectos tales como la proliferación celular y el estrés oxidativo. Así mismo, pueden ser investigados los efectos sobre cualquier otro órgano como el cerebro, hígado, corazón y riñones. Si bien los resultados obtenidos de la experimentación *in vivo* en animales, no pueden ser trasladados directamente a nivel de biología humana, debiendo ser interpretados adecuadamente, la información obtenida es de gran valor de cara a una mayor comprensión del ciclo de vida y la cinética toxicológica de las NPs (EU-OSHA y col., 2009).

En general, los datos disponibles de toxicidad *in vivo* de los NMs son escasos, centrándose básicamente en los metales insolubles y los óxidos metálicos. Estos se indican en la **Tabla 7**, mencionando los principales órganos afectados. Además, se observa que en muy pocos de ellos se comparan los valores correspondientes a una misma especie química a

distintas escalas (nano, micro o macro escala), por lo que los datos son insuficientes para llegar a conclusiones generales.

**Tabla 7.** Estudios de toxicidad *in vivo* de NMs.

| Nanopartículas   | Tamaño                   | Evidencia experimental de toxicidad  | Referencia                   |
|--|--------------------------|--|------------------------------|
| Ag   | 20- 40 nm                | Sin toxicidad en las condiciones ensayadas.  | Munger y col., 2014          |
| Ag   | 18- 19 nm                | Provocó una respuesta inflamatoria en los alveolos y alteraciones en la función pulmonar. Se observaron depósitos de AgNPs en hígado, bulbo olfatorio, cerebro y riñón.  | Sung y col., 2009            |
| Au   | 13.5 nm                  | Con concentraciones altas > 1100 µg/kg de peso disminuyó el peso corporal.   | Zhang y col., 2010           |
| NP y micropartícula (MP) de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 30 nm y micro escala     | 30 nm Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NPs produjo cambios histopatológicos en hígado, riñón y bazo. Inhibición de la acetilcolinesterasa cerebral, afectando a la conducción de transmisión sináptica y el nervio.  | Kumari y col., 2012          |
| NP y MP de Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                  | 30, 40 nm y micro escala | 30 y 40 nm Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NPs fueron más tóxicas (mayor aumento del estrés oxidativo y mayores lesiones en el hígado) que Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> a macroescala.  | Prabhakar y col., 2012       |
| TiO <sub>2</sub>   | 21 nm                    | Provocó un aumento del daño al ADN en los globulos blancos, de los niveles de 8-oxodG en el hígado y del porcentaje de células positivas a γH2AX en la médula ósea.  | Trouiller y col., 2009       |
| Si   | 37 y 83 nm               | No se observó inflamación pulmonar, o efectos histopatológicos pulmonares significativos.  | Sayes y col., 2010           |
| SiO <sub>2</sub> y sílice amorfa sintética (SAS)           | 202 nm                   | Tras 84 días de tratamiento aumentó la incidencia de fibrosis hepática con las SiO <sub>2</sub> NPs. El SAS se acumuló en el bazo.   | Van der Zande y col., 2014   |
| NP, MP e iones de Cu                                       | 23.5 nm y 17 µm          | DL <sub>50</sub> de CuNPs= 413 mg/kg y CuMPS= > 5000 mg/kg. Los órganos diana fueron el hígado, riñón y bazo. Presentaron glomerulitis, degeneración y necrosis del túbulo renal, presencia de líquido proteico en el túbulo renal, esteatosis del tejido hepático, atrofia del bazo, reducción de unidades esplénicas y fibrosis. | Chen y col., 2006            |
| Nanoarcilla de montmorillonita                             | 10-60 nm                 | Sin toxicidad en las condiciones ensayadas.  | Shi y col., 2006             |
| NP y MP de ZnO   | 20 nm y micro escala     | Provocaron lesiones microscópicas en hígado, páncreas, corazón y estómago a dosis bajas.   | Pasupuleti y col., 2012      |
| ZnO  | 100 nm                   | Provocó cambios significativos en los análisis hematológicos y bioquímicos de la sangre. Efectos adversos en estómago, páncreas, ojos y glándula prostática.   | Kim y col., 2014             |
| Chitosan   | Varios                   | Sin toxicidad en las condiciones ensayadas.  | Yoksan y Chirachanchai, 2008 |
| Nanotubos de carbono de pared múltiple                     | Hasta 450 µm             | Sin toxicidad en las condiciones ensayadas.  | Carrero-Sánchez y col., 2006 |
| Puntos cuánticos de CdSe                                   | 3-3.5 nm                 | Penetró en la barrera intestinal. Provocó daños oxidativos y genotóxicos.  | Alaraby y col., 2015.        |

La experimentación mediante metodologías *in vitro*, es otra de las prácticas principales en el estudio de la toxicidad orientada a la evaluación de riesgos sobre la salud humana. Los estudios *in vitro* que se realizan sobre tejidos, células o componentes celulares aislados, pueden evaluar y ayudar a comprender los mecanismos de acción que desencadenan los posibles daños, en caso de existencia de dicha toxicidad (SCENIHR, 2009). Sin embargo, los problemas típicos de estos estudios proceden de la administración de dosis no relevantes fisiológicamente, agregación de partículas, exposición directa de las células al NM, así como la interpretación de los resultados (EFSA, 2009).

A día de hoy existen numerosos estudios *in vitro* que han demostrado la toxicidad de una amplia gama de NMs en células humanas y animales (**Tabla 8**). En general, los NMs inducen efectos tóxicos diversos, tales como la disminución de la viabilidad celular, alteración en la integridad del ADN, daño genotóxico al ADN, producción de especies reactivas del oxígeno, etc.

Actualmente los efectos toxicológicos resultan muy difíciles de determinar, particularmente en el ser humano, ya que los datos son muy limitados. Además es necesario considerar las propiedades físico-químicas de las NPs, las vías de exposición, las dosis, la respuesta del organismo y los efectos de la duración y la frecuencia de exposición de los NMs en la población (Hoet y col., 2004). La guía de la EFSA de 2011 para evaluar el riesgo de la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología en los alimentos y en la cadena alimentaria, recomienda una serie de pruebas para estudiar la toxicidad de los NMs tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo ensayos para evaluar la integridad de la membrana como por ejemplo, la liberación de la LDH, reducción del MTT, generación de las EROs o resistencia transepitelial. Además también considera necesario realizar pruebas de genotoxicidad tales como el micronúcleo o el ensayo cometa (EFSA Comité Científico, 2011a).

### **II.4.1.3.1. Mecanismos de toxicidad**

La mayoría de los estudios científicos existentes designan al estrés oxidativo como el mecanismo central del efecto toxicológico de las NPs manufacturadas. Dicho estrés desencadena una serie de eventos celulares y moleculares que tienen diferentes consecuencias: respuesta inflamatoria, modulación de la proliferación y diferenciación celular e incluso la muerte celular.

**Tabla 8.** Estudios de toxicidad *in vitro* de NMs.

| Nanopartículas   | Tamaño   | Evidencia experimental de toxicidad   | Referencia                  |
|--|--|---|-----------------------------|
| Ag   | 10, 30, 60 nm  | Disminución de la viabilidad celular y cambios en el perfil metabólico de queratinocitos de piel (HaCaT).   | Carrola y col., 2016        |
| Ag   | 20, 40 y 100 nm  | Inducción de estrés oxidativo, activación de la actividad lisosomal, interrupción del citoesqueleto de actina, estimulación de la fagocitosis e inhibición de Na-K-ATPasa en hematocitos de mejillón y células branquiales.   | Katsumiti y col., 2015      |
| Au   | 25- 52 nm  | Daño en la integridad de la membrana celular y aumento de la liberación de LDH y en la producción de EROs en las células humanas de epitelio alveolar basal (A549).   | Tang y col., 2015           |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub><br>Al   | 30 y 40 nm<br>50, 80 y 120 nm                                  | AlNPs disminuyeron la viabilidad celular y la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares de rata (NR8383).   | Wagner y col., 2007         |
| ZnO  | 26, 62, 90 nm  | Disminución de la viabilidad celular debido al estrés oxidativo por disminución de los niveles de glutatión y aumento de EROs y lactato deshidrogenasa (LDH). Deleción de las células Caco-2 en la fase G <sub>1</sub> y acumulación de células en las fases S y G <sub>2</sub> /M. | Kang y col., 2013           |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>   | 6 nm   | Disminución de la viabilidad celular, alteración del potencial de membrana mitocondrial y producción de EROs en células de carcinoma cervical humano (HeLa), carcinoma de pulmón humano (A549) y riñón embrionario humano (Hek293).   | Shukla y col., 2015         |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>   | 8 nm   | Provocaron daño al ADN y presentaron actividad mutagénica en linfocitos de sangre periférica y células HEK-293.   | Gomaa y col., 2013          |
| BaO  | Nd   | Aumentó los niveles de peroxidación de lípidos, catalasas y superóxido dismutasa, acompañado de un incremento de las EROs y activación de las caspasas-3, además de daño al ADN de fibroblastos embrionarios de ratón (L929).   | Alarifi y col., 2016        |
| Fullerenos (C <sub>60</sub> )<br>Nanotubos de carbono (SWCNT)<br>Negro carbón (NC) | 0.7 nm (C <sub>60</sub> )<br>0.9- 1.7 nm (SWCNT)<br>14 nm (NC) | No provocaron muerte celular. SWCNT disminuyó la proliferación celular y detuvo el ciclo celular en la fase G <sub>1</sub> de las células FE1.  | Jacobsen y col., 2008       |
| SiO <sub>2</sub>   | 9, 15, 30 y 55 nm  | Provocaron daño en el ADN en las células V79 y A549.  | Maser y col., 2015          |
| TiO <sub>2</sub>   | 10 nm  | Disminución de la actividad clonogénica y formación de micronúcleos con la forma rutilo en fibroblastos de ratón Balb/3T3.  | Uboldi y col., 2016         |
| TiO <sub>2</sub>   | 24.4 nm  | No produce daño al ADN en células del tejido gonadal de truchas arco iris.  | Vevers y Jha, 2008          |
| Cu   | 7 nm   | Disminución de la viabilidad celular, daño oxidativo al ADN y aumento de la frecuencia de formación de micronúcleos en macrófagos de ratón RAW 264.7 y linfocitos de sangre periférica.   | Di Bucchianico y col., 2013 |
| Si   | 12, 5-10, 10-15 nm y 2 µm                                      | Disminución de la viabilidad celular, aumento en la formación de micronúcleos y cambios significativos en la expresión de genes implicados en funciones lisosomales tamaño dependiente en células epiteliales pulmonares de ratón (FE1)   | Decan y col., 2016          |
| Mo   | 40 nm  | Disminución de la viabilidad, aumento de la producción de EROs y disminución de los niveles de GSH y catalasa en células L929. Además detección del ciclo G <sub>2</sub> /M y daño al ADN.  | Siddiqui y col., 2015       |

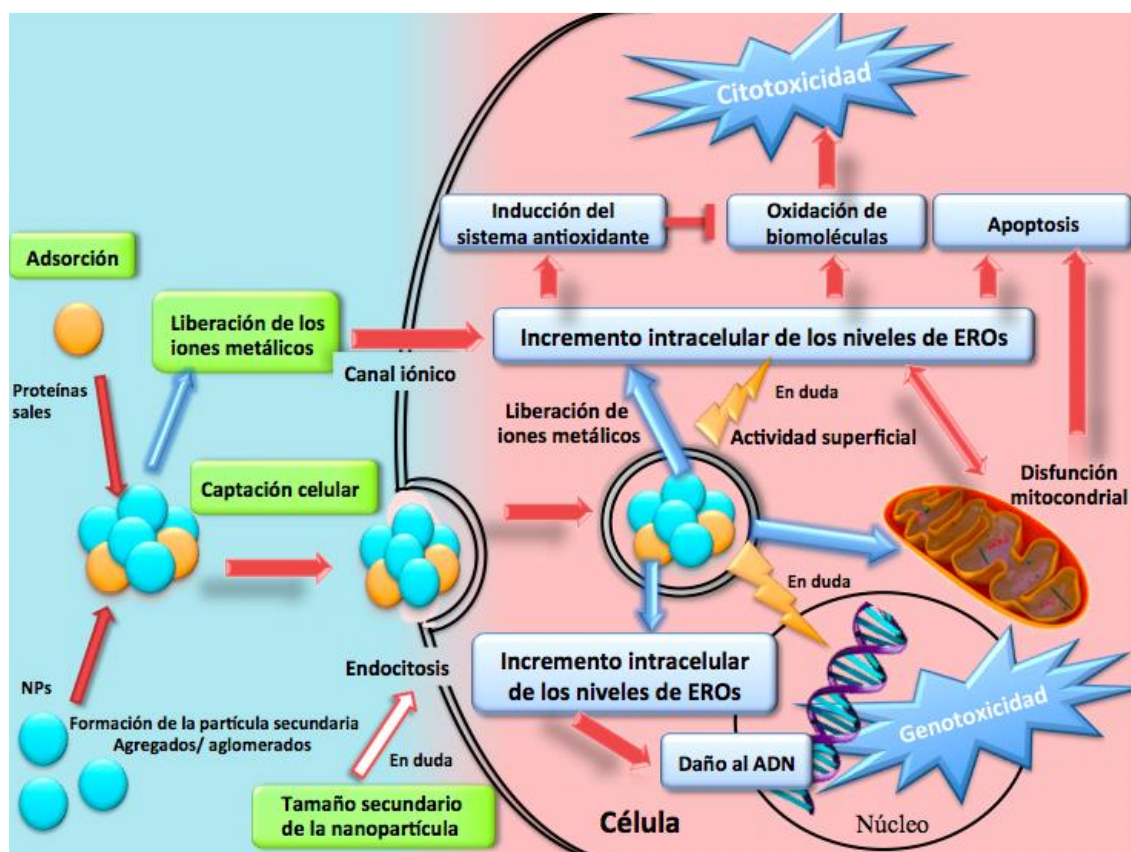
En concreto, la toxicidad de las AgNPs parece estar asociada con su naturaleza oxidativa e inflamatoria (Cho y col., 2009), la cual genera genotoxicidad (Asharani y col., 2009) y citotoxicidad (Husain y col., 2005). La **Figura 22** muestra un esquema de los mecanismos de toxicidad de las NPs.

Los seres humanos y la mayoría de los organismos eucariotas necesitan oxígeno para mantener una producción de energía suficiente para sobrevivir, aunque su utilización implica la formación de EROs. En el organismo debe existir un equilibrio entre las EROs y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se rompe a favor de las EROs se produce el denominado estrés o daño oxidativo (Kohen y Nyska, 2002).

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras (Namiki, 1992; Vicario, 1997; Van Haaften y col., 2003). Dentro de este concepto genérico, las formas parcialmente reducidas del oxígeno se denominan EROs, ya que generalmente son más reactivas que la molécula de oxígeno en su estado fundamental (Chandra y col., 2000). EROs es un término global utilizado para referirse tanto a radicales libres oxigenados como a otros derivados del oxígeno no radicales con capacidad de generar radicales libres. Las EROs se pueden generar en todo el organismo a partir de fuentes endógenas, como son los productos de la respiración celular o de la respuesta inflamatoria, y también proceder de fuentes exógenas como consecuencia por ejemplo de la acción de las NPs. Hay tres hipótesis principales según las cuales las NPs pueden inducir estrés oxidativo.

1. Las NPs pueden ser redox-activas o tener superficies o propiedades que catalicen la actividad redox, provocando estrés oxidativo y la generación de exceso de las EROs (Petersen y Nelson, 2010).
2. Las NPs pueden ser biopersistentes, lo que significa que una vez que entran en el sistema biológico éstas no se degradan o se descomponen a lo largo del tiempo, si no que permanecen en el sistema induciendo una inflamación en el sitio específico o una inflamación sistemática, esta inflamación inicia el reclutamiento de leucocitos los cuales se activan y generan un exceso de EROs (Knaapen y col., 1999).

- Las NPs pueden entrar en la célula e interactuar físicamente causando daño estructural en orgánulos como la mitocondria. El daño a la mitocondria puede permitir la disrupción de la cadena transportadora de electrones y la producción de adenosina trifosfato (ATP), lo que provoca la generación de un exceso de EROs (Petersen y Nelson, 2010).



**Figura 22.** Mecanismos de toxicidad inducidos por NPs. Adaptado de Horie y col., 2012.

En el caso concreto de las AgNPs, además pueden interactuar con proteínas y enzimas con grupos tioles de las células de mamífero. Estas proteínas y enzimas como glutatión, tiorredoxina, superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa de tiorredoxina, son componentes claves para el mecanismo de defensa antioxidante de las células, que es el responsable de neutralizar el estrés oxidativo de las EROs generadas por las NPs (Ahamed y Siddiqui, 2007). Por tanto, se sugiere que las AgNPs pueden disminuir los mecanismos de defensa antioxidante, a través de la reducción de glutatión, inactivación de la SOD, promoviendo la peroxidación lipídica, etc (Carlson y col., 2008; Piao y col., 2011).

En consecuencia, la acumulación de las EROs y el estrés oxidativo provocan una gran cantidad de eventos fisiológicos y celulares incluyendo estrés, perturbación y destrucción de la mitocondria, apoptosis, inflamación y daño al ADN (Ahamed y col., 2010). Las EROs atacan todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo sustratos lipídicos, proteínas y ARN aunque el ADN es la principal molécula diana de los procesos oxidativos (Kawanishi y col., 2006). La generación de las EROs tienen la capacidad de atacar al ADN a través de diferentes mecanismos para generar aberraciones cromosómicas, roturas de cadena simple, roturas de cadena doble, e inducir daño oxidativo a las bases, entre otras lesiones (Petersen y Nelson, 2010; Li y col., 2012; Nymark y col., 2013; Kim y col., 2011; Mei y col., 2012; Ghosh y col., 2012). Las roturas del ADN bloquean la transcripción y la replicación dando como resultado una aceleración de la citotoxicidad y la inestabilidad genómica (Khanna y Jackson, 2001). Además del papel de las EROs en el daño al ADN, también es posible que las propias NPs interactúen directamente con las proteínas y el ADN causando efectos genotóxicos (Foldbjerg y Autrup, 2013).

La mitocondria parece ser la diana sensible de la toxicidad de las NPs (Manke y col., 2013). Las mitocondrias son centros importantes de señalización durante la apoptosis, y la pérdida de la integridad mitocondrial puede ser inducida o inhibida por muchos reguladores apoptóticos (Indran y col., 2011). La apoptosis es una muerte fisiológica que se produce por activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de la membrana, y sólo se va a presentar pérdida de dicha integridad al final del proceso (Elmore, 2007). Se acompaña de otras características morfológicas y bioquímicas típicas como la condensación de la cromatina, la fragmentación internucleosomal del ADN, la activación de las caspasas y el burbujeo de la membrana plasmática. Durante el proceso de apoptosis, las caspasas son consideradas como el factor central que desencadena la cascada de eventos de escisión proteolítica. Existen dos vías de activación de las caspasas: la vía de los receptores de la muerte celular o extrínseca en la que participan los miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) localizados en la superficie celular, y la vía mitocondrial o intrínseca que está controlada por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Debatin y Krammer, 2004). La ruta de activación del receptor de muerte está mediada con un complejo de señalización inductor de la muerte, que consta de un dominio de muerte asociado a Fas y la procaspasa-8, que activan la caspasa-8 (Kim y col., 2002). La caspasa-8 activa la caspasa-3, lo que lleva a la apoptosis. La vía mitocondrial implica la escisión de las proteínas pro-apoptóticas de la caspasa-8, liberando el citocromo c

al citosol. El citocromo c activa la caspasa-3 y caspasa-9 (Elmore, 2007). La caspasa-3, en particular, está asociada con la ejecución de la apoptosis e induce el gran número de cambios morfológicos característicos de las células que sufren apoptosis (Shi, 2002).

El proceso de apoptosis se puede iniciar también como consecuencia del daño severo en el ADN. La activación del gen p53 llamado “guardián del genoma” detiene el ciclo celular en la fase G1, posibilitando la reparación del material genético en aquellas células que presentan un daño débil en el ADN, antes de la siguiente replicación. Sin embargo, cuando la célula presenta un daño tan severo en el ADN que no puede ser reparado, el gen p53 induce la muerte celular por apoptosis (Somasundaran y El-Deiry, 2000).

#### ***II.4.1.3.2. Biocinética de los nanomateriales***

La biocinética abarca la absorción, distribución, metabolismo y la excreción o eliminación (ADME) de sustancias en el organismo. Los datos experimentales de los que se dispone hasta ahora indican que es probable que las características de las NPs influyan sobre su absorción, distribución, metabolismo, (biotransformación) y excreción/eliminación (Roszek y col., 2005; Des Rieux y col., 2006; Singh y col., 2006; Oropesa y Jaurégui, 2012; Abdelhalim y col., 2012). La **Figura 23** muestra un esquema de la biocinética de las NPs.

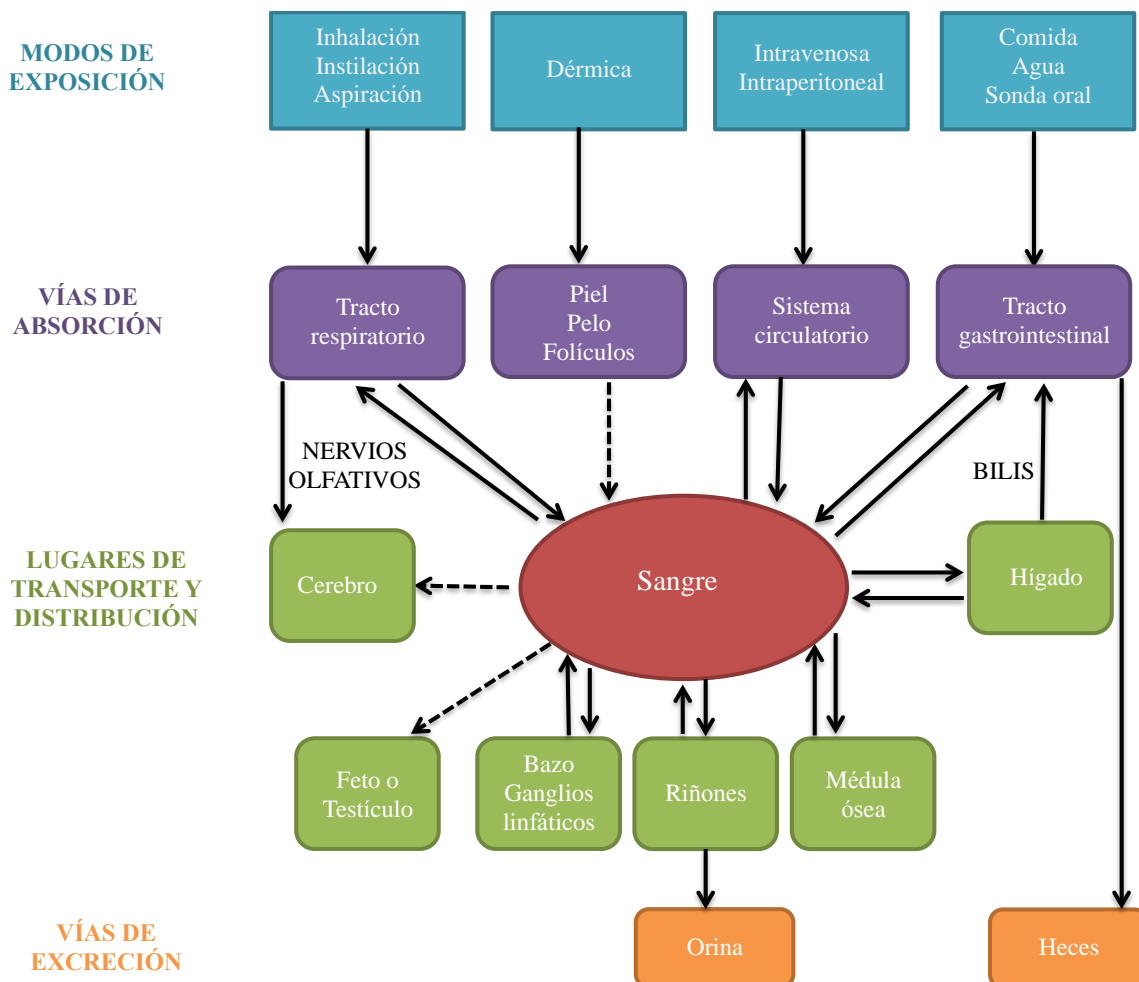
Independientemente de la vía de entrada de las NPs en el organismo, ya sea por vía inhalatoria, dérmica o por ingestión, el epitelio constituye la primera barrera física frente a la penetración de sustancias externas, gracias a sus características de impermeabilidad. Excluyendo situaciones patológicas o exposiciones a sustancias tóxicas que afecten a la permeabilidad del epitelio, es poco probable la penetración de NPs, por la vía paracelular o intercelular. Por tanto, la penetración del epitelio por parte de NPs debe implicar una transferencia transcelular.

#### ***II.4.1.3.3. Mecanismo de internalización***

Todos los tipos de células del cuerpo usan el proceso de endocitosis para comunicarse con los ambientes biológicos. Este proceso es dependiente de energía a través del cual las células internalizan iones y biomoléculas (Iversen y col., 2011). Las vías de endocitosis se clasifican en endocitosis mediada por clatrina y caveolina, fagocitosis, macropinocitosis y

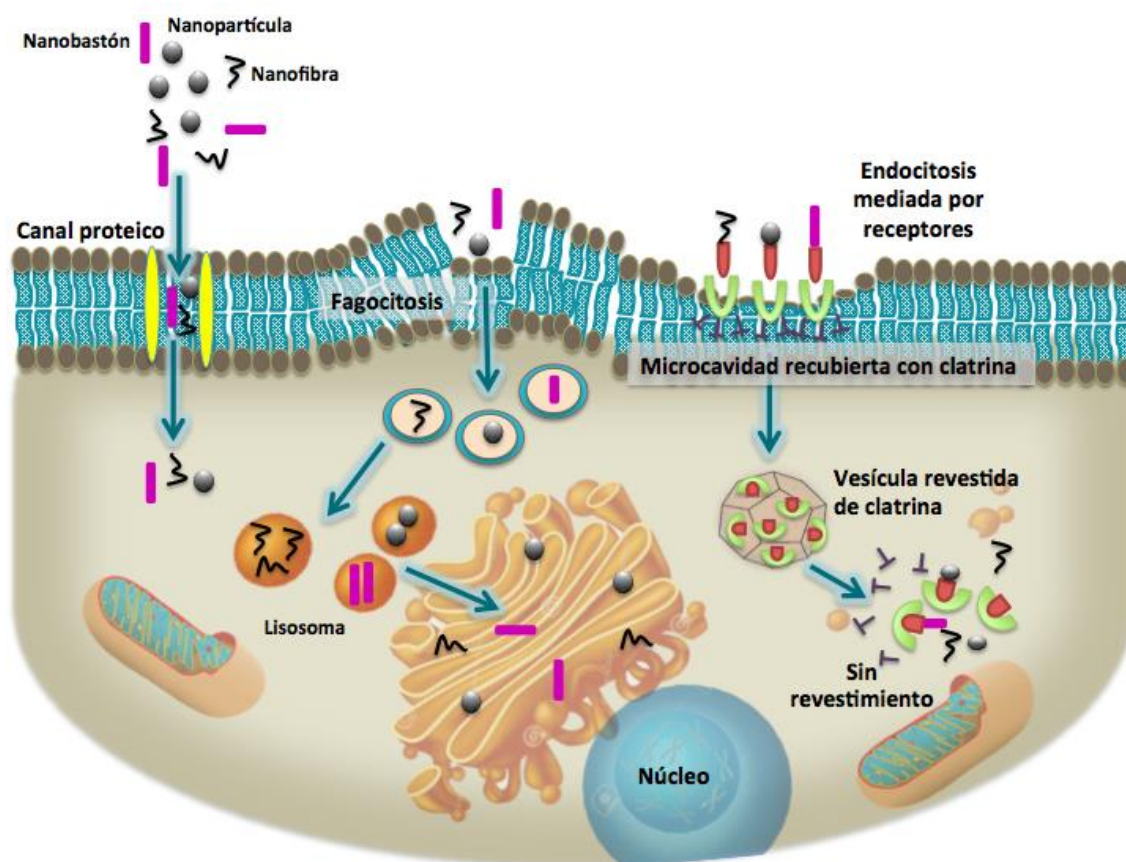


pinocitosis (Oh y Park, 2014). La endocitosis mediada por clatrina y caveolina indica endocitosis mediada por receptores. Muchos tipos de células utilizan las vías de endocitosis mediadas por clatrina y caveolina para internalizar los materiales a nanoescala, incluyendo virus y NPs (Pelkmans y col., 2001; Wang y col., 2009b; Tomatis y col., 2010). Estas vías de endocitosis son las vías más importantes para la internalización de NPs en las células debido a que las NPs pueden estar recubiertas con proteínas plasmáticas cuando se exponen a soluciones fisiológicas (Cedervall y col., 2007; Lynch y Dawson, 2008). La vía de fagocitosis se utiliza cuando las células fagocíticas internalizan materiales extraños con tamaños mayores de 0,5  $\mu\text{m}$  (Young, 2006) Esta vía depende de la actina y está restringida a fagocitos específicos, tales como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. La vía de macropinocitosis es un proceso no específico para internalizar fluidos y partículas en la célula, mientras que la vía de pinocitosis absorbe los fluidos biológicos del ambiente externo de una célula (Geiser, 2010).



**Figura 23.** Biocinética y lugares de acumulación de las NPs (Shi y col., 2013).

Las NPs que circulan en el torrente sanguíneo se encuentran e internalizan en muchos tipos de células a través de la membrana plasmática. La membrana plasmática, formada por una bicapa lipídica y proteínas, es una membrana selectivamente permeable que transfiere materiales que son esenciales para sostener la vida de la célula. Naturalmente, los materiales necesarios para la vida de la célula, tales como iones y proteínas de tamaño nanométrico, pueden pasar a través de la bicapa lipídica utilizando canales especializados de proteínas de transporte de membrana (Woolf y Roux, 1996). Así, la membrana plasmática de las células seleccionará las vías de endocitosis de las nanopartículas dependiendo de su tamaño, forma y superficie química (**Figura 24**).



**Figura 24.** Esquema ilustrativo de los posibles mecanismos de internalización de las NPs.

Numerosos estudios han demostrado la rápida internalización de un amplio rango de NPs en diferentes tipos de células, contando o no con fagocitosis especializada, sin embargo, los mecanismos que entran en juego no han sido detalladamente investigados. Por otra parte, muchos de estos estudios han sido realizados *in vitro*, bajo condiciones donde el contacto entre las NPs y el medio de cultivo provoca la adsorción cuando por naturaleza habrían

facilitado la internalización mediante receptores, sin tener en cuenta la tendencia a la agregación (Baeza-Squiban y Lanone, 2011).

### ***II.4.1.3.4. Transporte y distribución***

Como resultado de las propiedades físico-químicas de las NPs, éstas tienen la capacidad de atravesar barreras biológicas mediante el fenómeno de translocación. Dicho proceso permite que las NPs puedan depositarse en partes del organismo diferentes a las de su entrada, manteniendo su integridad como partícula. En cierto sentido, la capacidad de translocación de las NPs es una de las características más apreciadas por la industria biomédica y es la clave del diseño de NPs versátiles para su futura aplicación a nivel terapéutico. No obstante, esta propiedad específica de las NPs incrementa en gran medida su potencial toxicológico cuando la penetración de NPs en el organismo no es deseada. La distribución de determinadas NPs en el organismo, puede derivar en su acumulación en órganos concretos y provocar el desarrollo de patologías. El proceso de translocación de NPs no se produce de una forma completamente arbitraria, si no que aprovecha determinadas rutas, que se describen a continuación:

#### **- Translocación a través del sistema circulatorio.**

Dicho proceso tiene lugar cuando las NPs alcanzan el aparato circulatorio. Su llegada al torrente sanguíneo se puede producir como resultado de la penetración en diferentes zonas del pulmón o del tracto digestivo, a partir de este momento, las partículas pueden acceder al torrente sanguíneo por diferentes vías, por ejemplo a través del canal linfático pulmonar o torácico o atravesando el epitelio alveolar o GI a cualquier parte del organismo. (Des Rieux y col., 2006; Mühlfeld y col., 2008; Bouwmeester y col., 2009). Una vez en el torrente sanguíneo, las NPs pueden alcanzar cualquier parte del organismo. El principal órgano diana es el hígado, seguido del bazo y otros órganos del retículo endotelial. Algunos estudios han demostrado su localización en corazón y riñones. (Kreyling y col., 2002; Johnston y col., 2010).

#### **- Translocación a través del sistema nervioso.**

La translocación de partículas sólidas en el tracto respiratorio a través de los axones neuronales es una vía aparentemente específica de las NPs. Esta translocación es el resultado de la deposición de NPs en la región nasal. La corta distancia que existe entre la mucosa

olfativa nasal y el nervio olfativo puede permitir su acceso al sistema nervioso. A partir de aquí, las NPs pueden ser transportadas por el nervio olfativo a través de las de las neuronas olfativas, distribuyéndose a lo largo del sistema nervioso central (Oberdörster y col., 2005). Estudios en animales han demostrado que, tras depositarse en la región nasal después de su inhalación, las NPs pueden acumularse en el cerebro mediante el mecanismo de transporte mencionado. Otra vía por la cual las NPs podrían acceder al sistema nervioso central es mediante algún tipo de transferencia a través de la barrera hematoencefálica, caracterizada por la existencia de uniones altamente efectivas entre las células endoteliales, de cara a evitar la penetración de partículas por la vía intercelular.

Según se ha comprobado tras la administración por vía oral de NPs de plata y oro, los NMs pueden llegar al cerebro (Loeschner y col., 2011; Hillyer y Albrech, 2001). Además, parece que ciertos NMs pueden atravesar la placenta, pero no existe información sobre su transferencia a través de la leche (EFSA, 2009).

#### ***II.4.1.3.5. Metabolismo***

Actualmente, no existen todavía demasiados estudios de metabolización de las NPs, aunque se ha indicado que puede depender, entre otros, de la composición química de su superficie. En el caso de los poliméricos se destaca la posibilidad que puedan ser biodegradables, mientras que para los metales o sus óxidos se indica que su lenta disolución puede ser un factor importante en su metabolismo (EFSA, 2009). En el caso de NMs inertes, como por ejemplo las NPs de plata, oro, TiO<sub>2</sub> o nanotubos de carbono, parece improbable que puedan ser metabolizados por el proceso enzimático hepático. No obstante, las NPs funcionalizadas pueden perder sus grupos funcionales o simplemente ser modificados (Baeza-Squiban y Lanone, 2011).

#### ***II.4.1.3.6. Eliminación***

Finalmente, la información acerca de la excreción de NMs es aún más limitada. Una vez absorbidos, los NMs pueden pasar al hígado y excretarse a través de la bilis al tracto GI o pueden eliminarse vía renal (Bouwmeester y col., 2009). El aclaramiento o limpieza renal conlleva una filtración glomerular, secreción tubular, y por último, eliminación por la orina. La filtración de las moléculas a través de capilares glomerulares depende del tamaño de las

NPs. Aquellas con diámetros inferiores a 5.5 nm pueden ser filtradas, ya que corresponden al diámetro de los poros de las células endoteliales vasculares. Aquellas mayores de 8 nm se mantienen en el torrente sanguíneo y se tratan en el sistema retículo-endotelial. Entre éstos dos diámetros, la carga eléctrica es relevante, ya que pueden adsorber moléculas, con lo que incrementarán su diámetro hidrodinámico, combinado con el factor de carga negativa de las membranas capilares (Longmire y Choyke, 2008).

La filtración glomerular es favorable para las NPs comprendidas en el rango de 6 a 8 nm con carga positiva o neutra. A pesar de ello, una vez en el túbulo renal, las NPs filtradas pueden ser reabsorbidas por el epitelio tubular, aunque hasta la fecha no existe información que respalde o niegue esta afirmación con respecto a la reabsorción. Se sugiere que los NMs inorgánicos insolubles (poliestireno, TiO<sub>2</sub>, etc.) pueden ser retenidos durante largos periodos de tiempo y acumularse en el sistema retículo endotelial del hígado y bazo o ser transportados a otros órganos (EFSA, 2009).

### **II.5. LEGISLACIÓN APLICABLE A LA NANOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

En el ámbito económico y geográfico de la Unión Europea (UE), es la Comisión Europea (CE) el principal organismo a nivel de propuesta reglamentaria y legislativa. En este sentido, los estados miembros de la Unión pueden legislar y adoptar medidas vinculantes, aunque éstos solo ejercerán su competencia en la medida en que la Unión no lo haya hecho.

La legislación específica del sector proporciona un marco vinculante entre los fabricantes, importadores y usuarios para garantizar la seguridad de las sustancias y productos del mercado. Los NMs están regulados en la UE por diferentes reglamentos, que se refieren a ellos de manera implícita o explícitamente.

El Reglamento REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Químicos) no contiene disposiciones que se refieran de manera explícita a las NPs, las cuales entran en el ámbito de la definición de sustancia contenida en este reglamento (Reglamento (CE) N° 1907/2006; Parlamento Europeo y Consejo, 2006). Sin embargo, la guía REACH para los *‘Requisitos de Información y Evaluación de la Seguridad’* en su actualización de 2012 aborda directamente los NMs.

El reglamento de productos cosméticos publicado en 2009 (Reglamento (CE) n° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo) fue la primera legislación europea en introducir oficialmente una definición de nanomaterial. Tal definición consideraba a los nanomateriales como: “Materiales insolubles, biopersistentes y manufacturados intencionadamente, con una o más dimensiones externas, o estructura interna, dentro de la escala de 1 a 100 nm”. Según lo establecido en su artículo 13, los fabricantes o distribuidores de productos cosméticos están obligados, antes de introducirlos en el mercado, a notificar la presencia de NMs en el producto, su identificación química completa y una previsión razonable de las condiciones de exposición a las NPs.

En la UE, los aditivos para alimentos y piensos y los materiales en contacto con los alimentos son regulados por varias directivas y reglamentos. Los NMs son específicamente mencionados en los siguientes reglamentos recientemente revisados:

- Reglamento 10/2011 sobre materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos (Comisión Europea 2011b).
- Reglamento 450/2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes (Comisión Europea 2009).
- Reglamento 1169/2011 sobre suministro de información alimentaria facilitada al consumidor.

En noviembre de 2015, se aprobó el nuevo Reglamento (UE) 2283/2015 del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo relativo a los nuevos alimentos que proporciona seguridad jurídica en este campo. En este reglamento aparecen las definiciones de NMs y se consideran a los alimentos que contienen estos NMs como “nuevos alimentos”.

La **Tabla 9** muestra una visión general de la legislación actual de la UE en el sector de la agricultura, alimentos y piensos en referencia a los NMs.

## **II.6. ETIQUETADO Y REGISTRO DE PRODUCTOS DE CONSUMO CON NANOMATERIALES**

Varias partes interesadas, incluyendo el Parlamento Europeo, Estados Miembros de la UE, y diferentes ONGs han pedido una mayor transparencia, trazabilidad e información sobre el uso y la posible exposición a los NMs ya sea en el etiquetado de los productos que

contienen NMs o que hacen uso de la nanotecnología y/o con la introducción de registros para esos productos. Actualmente, la legislación Europea sobre alimentos, cosméticos y biocidas (**Tabla 9**), obliga al etiquetado del contenido de NMs en dichos productos, añadiendo la palabra “nano” entre paréntesis después del nombre de la sustancia en la lista de ingredientes. Pero además del etiquetado, que se coloca directamente sobre el producto, la información sobre los NMs utilizados se puede recopilar en un registro de productos.

**Tabla 9.** Marco jurídico de la UE que regula los procedimientos de autorización de NMs en aplicaciones agroalimentarias.

|  | Legislación UE    | Definición | Etiquetado | Guía  |
|--|-------------------|------------|------------|---|
| <b>Productos:</b>  |                   |            |            |   |
| ❖ Biocidas   | (UE) No 528/2012  | Sí         | Sí         | Pendiente   |
| ❖ Productos de protección de plantas                                   | (CE) No 1107/2009 | No         | No         | Guía de la EFSA (por vía oral a través de los alimentos) (Comité científico de la EFSA, 2011) |
| <b>Alimentos/ Piensos:</b>   |                   |            |            |   |
| ❖ Información alimentaria a los consumidores                           | (UE) No 1169/2011 | Sí         | Sí         | No  |
| ❖ Nuevos alimentos/ piensos  | (UE) No 2283/2015 | Sí         | Sí         | No  |
| ❖ Materiales plásticos en contacto con los alimentos                   | (UE) No 10/2011   | No         | No         | Guía de la EFSA   |
| ❖ Materiales y objetos activos e inteligentes                          | (UE) No 450/2009  | No         | No         | No  |
| ❖ Aditivos alimentarios  | (CE) No 1333/2008 | No         | Sí         | Guía de la EFSA   |
| ❖ Piensos  | (CE) No 767/2009  | No         | No         | No  |
| <b>Químicos:</b>   |                   |            |            |   |
| ❖ Registro, evaluación, autorización y restricción de químicos (REACH) | (CE) No 1907/2006 | No         | No         | Guía de la ECHA (ECHA, 2012)  |
| ❖ Clasificación, etiquetado y envasado                                 | (CE) No 1272/2008 | No         | No         | No  |

Existe un determinado consenso en referencia a la necesidad de la creación de registros de identificación e inventario de nanosustancias o de productos que las contengan. Dicho interés es compatible con las medidas de adaptación del Reglamento REACH a nivel de la Unión Europea, aunque, la falta de directrices comunes, ha provocado que algunos países hayan desarrollado e implementado este tipo de iniciativas. Las primeras iniciativas encaminadas a la creación de un registro de nanosustancias tuvieron en su mayoría un carácter voluntario. Sin embargo, este tipo de iniciativas de carácter no obligatorio, no alcanzaron niveles satisfactorios a nivel de información y de participación de la industria (Milieu Environmental Law and Policy, 2012). Actualmente, existen varias iniciativas de

creación de planes de registro de información referente a nanomateriales de carácter obligatorio.

Francia publicó un decreto interministerial en 2012 (Ministère de l'Écologie du Développement durable et de l'Énergie 2012) sobre el registro obligatorio de NMs, el cual se aplica a todas las empresas y laboratorios de investigación que producen, distribuyen o importan más de 100 g al año de sustancias a escala nano. Este registro, no accesible al público, está considerado como la primera iniciativa regulatoria de duración indefinida con impacto directo en la industria de NMs. Otros países europeos como Bélgica y Dinamarca también han llevado a cabo un sistema de registro de NMs (un borrador de decreto para el registro belga (BiPRO y Öko-Institut 2013) y un proyecto de orden para el registro danés (Miljøministeriet y Miljøstyrelsen 2013) se han notificado a la Comisión Europea. Sin embargo, Alemania, como también algunos otros estados miembros, prefieren un registro europeo sobre los registros nacionales de productos ya que esto llevaría a una gestión más uniforme de los NMs en toda la UE (Umweltbundesamt 2014). La Agencia Federal Alemana para el Medio Ambiente (UBA) apoya la creación de un registro central de nanoprodutos a nivel europeo y ha publicado en 2014 un documento titulado: "Concepto para un registro europeo de productos que contienen nanomateriales". En el Reino Unido, la Autoridad de Seguridad Alimentaria (FSA) ha publicado una lista de los NMs que tienen permiso para ser utilizados en alimentos o en materiales en contacto con ellos (UK-FSA, 2013).





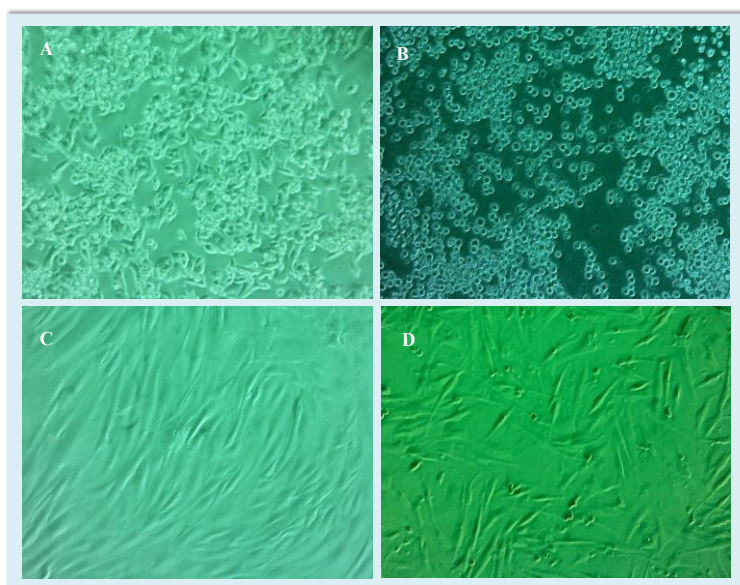
## CAPÍTULO III

### *Material y métodos*



### III.1. LÍNEAS CELULARES HUMANAS

Las principales vías de exposición a las AgNPs en el ser humano son la vía dermal por contacto dérmico, el tracto gastrointestinal por ingesta y el tracto respiratorio por inhalación (Johnston y col., 2010), en estos lugares las AgNPs pueden pasar a la circulación sanguínea y distribuirse por el organismo (Oberdorster y col., 2005). En este trabajo de investigación hemos usado cuatro líneas celulares humanas relevantes en la exposición de las AgNPs. Dos líneas tumorales humanas, la línea celular HepG2 que deriva originalmente de un carcinoma hepatocelular humano y la línea celular HL-60 que deriva de leucemia humana las cuales se obtuvieron de la colección de cultivos celulares del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid). Y otras dos líneas celulares normales humanas, fibroblastos de piel (NHDF) y fibroblastos de pulmón (HPF) los cuales se adquirieron de la casa comercial PromoCell GmbH (Heidelberg, Alemania). En la **Figura 25** se observa la morfología de las líneas HepG2, HL-60, NHDF y HPF al microscopio óptico.



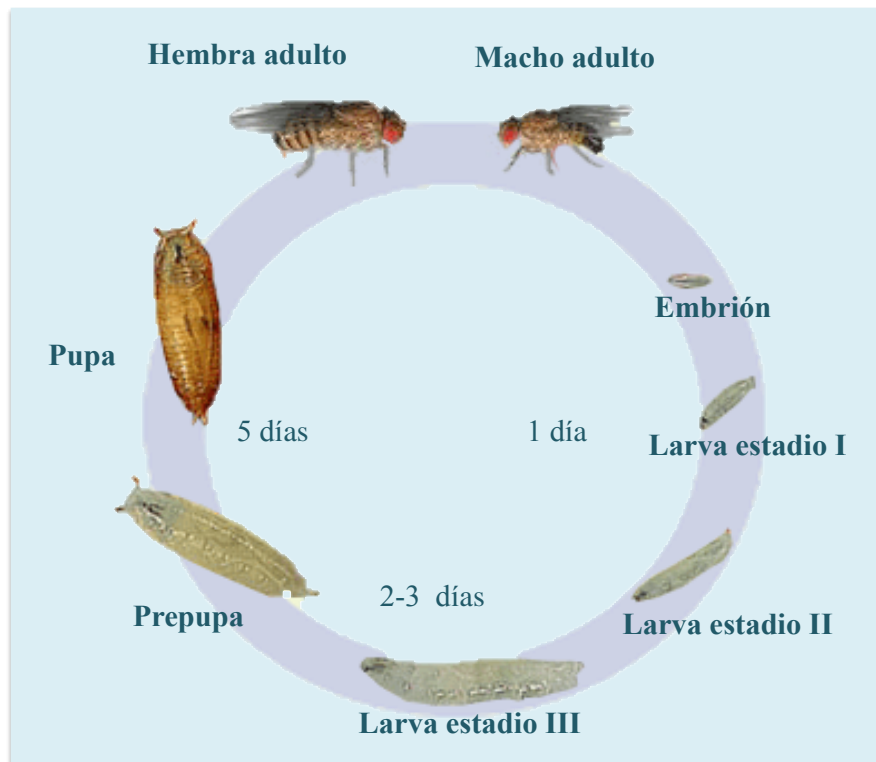
**Figura 25.** Morfología de las líneas HepG2 (A), HL-60 (B), NHDF (C) y HPF (D) al microscopio óptico.

En cuanto a las condiciones de cultivo, las células HL-60 y HepG2 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memory Institute) y en medio de cultivo definido de Eagle modificado por Dulbecco respectivamente, suplementados con un 10% de suero fetal bovino, 50 UI/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina y un 1% v/v L-Glutamina. Las células NHDF y

HPF se cultivaron como una monocapa en un medio basal de fibroblastos suplementado con 2% v/v de suero fetal bovino, 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos y 5 mg/ml de insulina. El crecimiento de las células se realizó a 37°C en una atmosfera saturada de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>. En la realización de todos los experimentos incluidos en este trabajo se han utilizado subcultivos con un número de pases de 10 a 17.

#### III.2. *DROSOPHILA MELANOGASTER*

*D. melanogaster* (Meigen) es un insecto del orden de los dípteros (dos alas), que se caracteriza por tener ojos rojos, un cuerpo de color amarillo marrón y anillos negros transversales que cruzan su abdomen. Su ciclo de vida comprende un período de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvarios que culminan con una metamorfosis completa (en el interior de la pupa), de la que finalmente emerge un imago o adulto (**Figura 26**). La duración del ciclo de vida completo es de 9 a 10 días en condiciones de laboratorio a 25 °C de temperatura y una humedad relativa del 60%.



**Figura 26.** Ciclo de vida de *D. melanogaster*.

*D. melanogaster* es uno de los organismos más usados en la investigación biológica siendo un modelo ideal para examinar la toxicidad y genotoxicidad de los NMs *in vivo*, debido al conocimiento de su genética y la genómica, la alta homología entre la mosca y los genes humanos y su corta vida (Ong y col., 2015). En el **artículo 6**, *D. melanogaster* se utilizó para evaluar el efecto genotóxico *in vivo* de las AgNPs de 4.7 y 42 nm, usando el ensayo SMART.

### III.3. COMPUESTOS QUÍMICOS

#### III.3.1. Nanopartículas de plata

En este trabajo de investigación se han utilizado tres AgNPs diferentes, AgNPs de  $4.7 \pm 1.0$  nm de tamaño y recubierta con polieterimida (PEI) y polivinilpirrolidona (PVP) y AgNPs de  $42 \pm 9$  nm de tamaño sin recubrimiento (desnuda) y AgNPs de 157 nm de tamaño recubiertas con citrato. Las características de las correspondientes NPs se muestran en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Características de las AgNPs utilizadas en este estudio obtenidas por NanoGap y Sigma-Aldrich.

| Referencia | Partículas | Tamaño <sup>a</sup> $\pm$ DS (nm) | Solución de dispersión                      | Densidad (g ml <sup>-1</sup> ) | Densidad de partícula (part l) | Color                                  | pH  |
|------------|------------|-----------------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--|-----|
| 2106-W     | AgNP 4.7   | $4.7 \pm 1$                       | Solución acuosa y recubiertas con PEI y PVP | 1.024                          | $1.75 \times 10^{19}$          | Negro y amarillo (cuando está diluido) | 9.3 |
| 2103-W     | AgNP 42    | $42 \pm 9$                        | Solución acuosa                             | 1.01                           | ND                             | Marrón                                 | ND  |
| 675318     | AgNP 157   | 157                               | Solución acuosa y recubiertas con citrato   | ND                             | ND                             | Rosáceo claro                          | 8.1 |

ND, datos no disponibles. PEI polieterimida. PVP, polivinilpirrolidona.

<sup>a</sup>Según lo establecido por la empresa.

#### III.3.2. N-acetilcisteína (NAC)

La NAC es un aminotiol y precursor sintético de cisteína intracelular y la glutatión (GSH). Entre los múltiples mecanismos que se le atribuyen destaca su actividad antioxidante, y por tanto su capacidad para atrapar o reaccionar con las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Zafarullah y col., 2003). En los **artículos 1, 2, 3 y 4**, la NAC (1, 5, 10 y 20 mM, 1 h) se empleó para demostrar su efecto protector frente a la citotoxicidad inducida por las

AgNPs de 4.7, 42 y 157 nm en las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF, usando el método MTT.

#### III.3.3. Benzopireno (BaP)

El BaP es un importante hidrocarburo aromático policíclico (HAP) carcinogénico, que sufre una activación metabólica a través de CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1. Durante el proceso metabólico, el BaP produce EROs a través del citocromo P4501A1 (CYP1A1) (Burczynski y Penning, 2000). Las EROs y sus metabolitos pueden causar daño oxidativo del ADN y formar aductos con el ADN. En el **artículo 5**, utilizamos el BaP como un control positivo de genotoxicidad (Petković y col., 2011; Han y col., 2012) a la concentración de 100  $\mu$ M.

#### III.3.4. Mitomicina C (MMC)

La MMC es un antibiótico natural aislado originalmente de la bacteria Gram-negativa *Streptomyces caespitosus*. Se utiliza habitualmente como agente quimioterapéutico en el tratamiento de varios tipos de cáncer, tales como la vejiga, colon, y cánceres de mama (Verweij y Pinedo, 1990). La MMC actúa como un agente alquilante del ADN desorganizándolo por medio de la formación de complejos con el ADN, además de inhibir la división celular interfiriendo en la biosíntesis del ADN (Snodgrass y col., 2010). Se ha demostrado que la MMC es capaz de generar mutaciones en el ADN (Ferrera y col., 2006). En el **artículo 6**, utilizamos la MMC como control positivo de genotoxicidad (Vlastos y col., 2013; Khabour y col., 2015) a la concentración de 2,5  $\mu$ g/ml.

#### III.3.5. Etopósido

El etopósido es un derivado semisintético de la podofilotoxina extraída del *Podophyllum peltatum* o mandrágora americana, que se utiliza como un agente quimioterapéutico frente al cáncer (Guevara y col., 2000). Este compuesto actúa inhibiendo la acción de la enzima topoisomerasa II, esencial para la replicación y transcripción del ADN. Se ha demostrado que el etopósido es capaz de inducir apoptosis en una gran variedad de líneas celulares tumorales (Nakaya y col., 1991). En el **artículo 7**, utilizamos el etopósido como un control positivo de apoptosis (Kumala y col., 2003; García y col., 2008, 2009; Mahmood y col., 2010), a la concentración de 5  $\mu$ M en la línea celular HL-60 y de 100  $\mu$ M en la línea celular HepG2.

### **III.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

La morfología, el tamaño y la agregación de las NPs son algunas de las propiedades físico-químicas que influyen en las respuestas toxicológicas de las mismas. Por tanto, estos parámetros hay que conocerlos antes de llevar a cabo cualquier ensayo biológico. Para ello empleamos dos técnicas diferentes, la microscopía electrónica de transmisión (MET) y la dispersión de luz dinámica (DLS).

#### **III.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

La MET es la técnica más importante para caracterizar NPs metálicas, ya que permite determinar el tamaño, la forma, estructura interna y, a través de difracción de electrones, las especies químicas de las NPs (Baker y col., 2004).

En nuestro estudio, el tamaño y la morfología de las AgNPs fueron examinadas empleando un MET (JEOL, modelo JEM 2100, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) del Centro de Microscopía Electrónica de la UCM. Las muestras se suspendieron en etanol para prevenir la aglomeración y la oxidación y se sonicaron durante 30 min para distribuir las partículas uniformemente (Branson 2510, 40 KHz). Posteriormente se depositó una gota de esta suspensión de AgNPs (3  $\mu$ l) en una rejilla de cobre recubierta de grafito, se dejó secar al aire y se observó al MET (**Figura 27**). Además, las AgNPs también se observaron al MET para determinar si se agregan después de su incubación en medio de cultivo libre de células (0.2% v/v) durante 24 h a 37°C (**Artículos 1, 2, 3 y 4**).

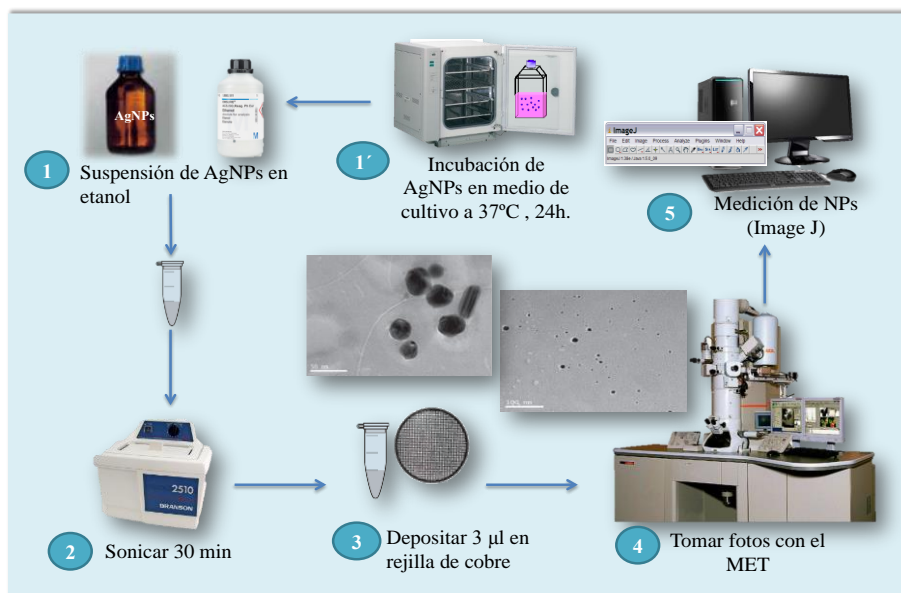
El tamaño promedio y la distribución de tamaño se obtuvo al analizar 100 NPs aproximadamente de campos visuales aleatorios, empleando el software Image J (Murdock y col., 2008).

#### **III.4.2. Dispersión de luz dinámica (DLS)**

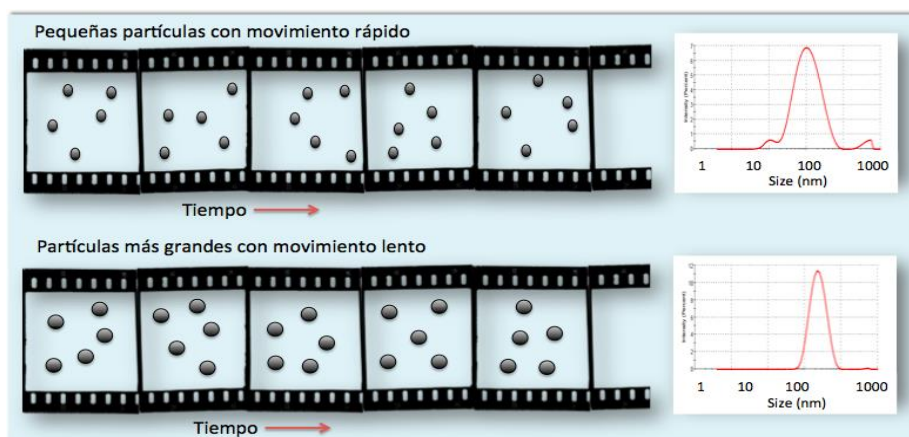
El DLS es un método que proporciona el diámetro hidrodinámico de las NPs, el cual se calcula mediante las diferentes medidas del movimiento browniano de estas (Berne y Pecora, 2000). La muestra se ilumina con un láser y la intensidad de la luz dispersada se registra continuamente, la intensidad fluctuará en función de los tamaños de las partículas (**Figura**



28), siendo las partículas más pequeñas más rápidas que las grandes. El diámetro obtenido por esta técnica es la de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión de traslación que la partícula que se está midiendo. Esto significa que el tamaño determinado por DLS puede ser diferente de uno determinado por microscopía electrónica (Lee y col., 2013a).



**Figura 27.** Determinación de la morfología y el tamaño por el MET.

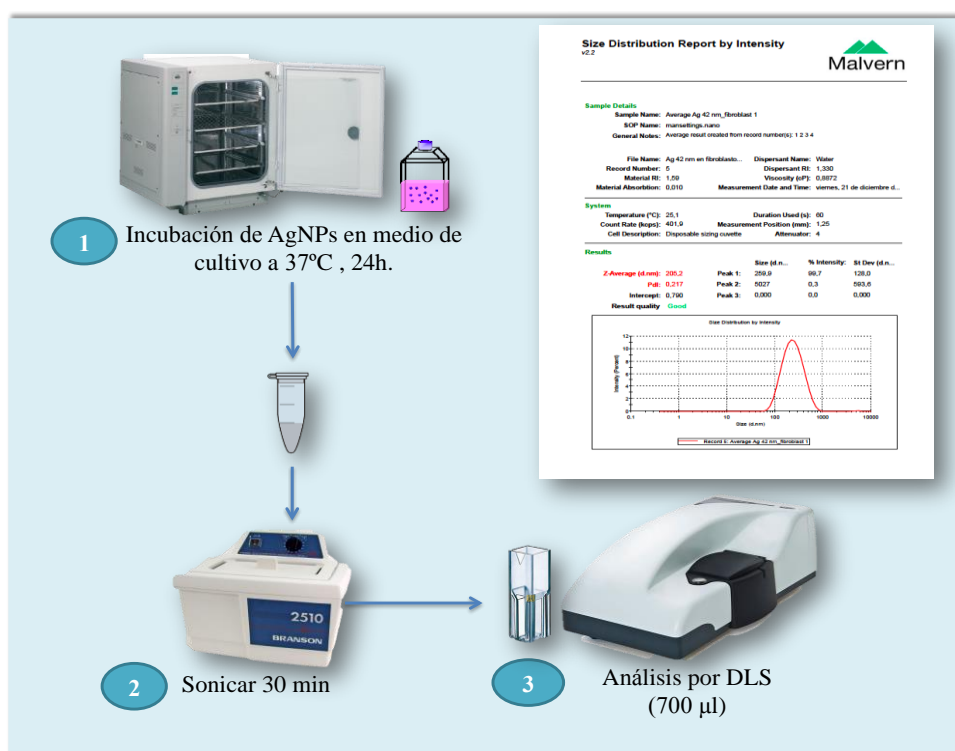


**Figura 28.** Esquema del fundamento del DLS.

En nuestro estudio el DLS se utilizó para la caracterización de tamaño hidrodinámico de las AgNPs después de la incubación en medio de cultivo libre de células durante 24 h, llevándose a cabo en el Zetasizer Nano-ZS del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, España, según lo descrito por Murdock y col. (2008) (**Figura 29**) (**Artículos 1, 2, 3 y 4**).

### III.5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Existen numerosos métodos para evaluar la citotoxicidad *in vitro*. En este trabajo de investigación se utilizaron dos: el método colorimétrico MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio y el método de la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) que miden respectivamente, actividad mitocondrial y permeabilidad de la membrana plasmática.

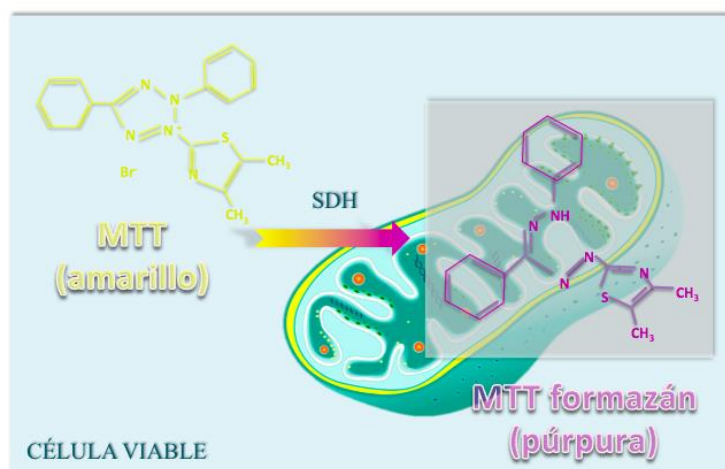


**Figura 29.** Determinación del tamaño hidrodinámico de NPs con DLS.

#### III.5.1. Método colorimétrico MTT

El método se basa en la metabolización de la sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo, a cristales de formazán, de color púrpura, por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales. La enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial (SDH) es la principal implicada en esta reacción reductora, así como los cofactores de nucleótidos de la pirimidina NADH y NADPH (**Figura 30**). Esta conversión, por tanto, sólo puede ocurrir en células viables (Martinez y col., 1998). Los cristales de formazán formados son solubilizados y la solución coloreada resultante se cuantifica espectrofotométricamente (A620nm-A690nm)

(Mosmann, 1983). Un incremento en el número de células viables está directamente relacionado con la cantidad de cristales de formazán formados, reflejado en la absorbancia obtenida.



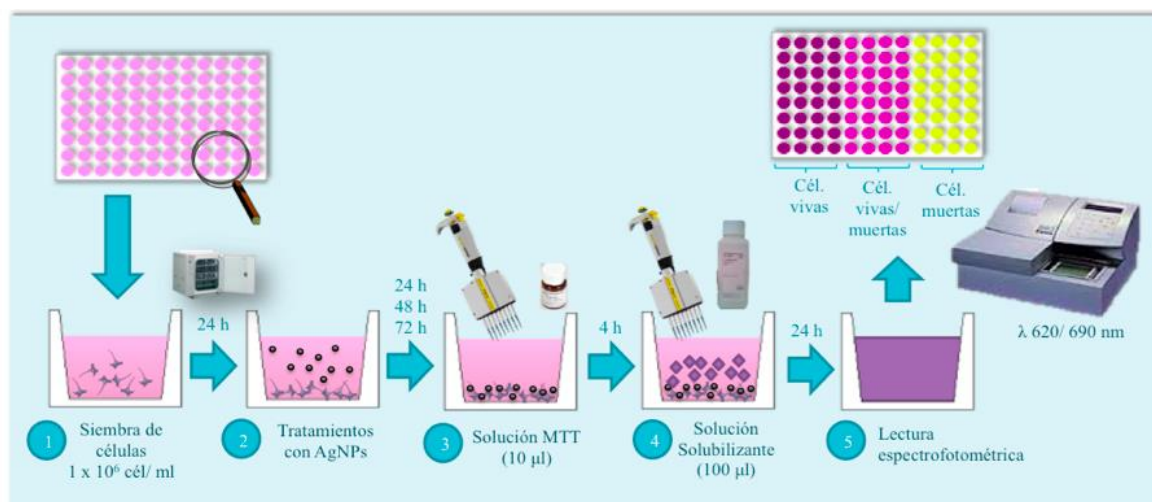
**Figura 30.** Reacción de metabolización del MTT a formazán, mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en células viables.

En el presente trabajo de investigación utilizamos el kit de proliferación celular I MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) de Roche, para evaluar la citotoxicidad de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las cuatro líneas celulares, HepG2, HL-60, NHDF y HPF (**Artículos 1, 2, 3 y 4**). Asimismo, también se utilizó para evaluar si la NAC tiene un efecto protector frente a la citotoxicidad de las AgNPs. Un esquema del procedimiento del método MTT se muestra en la **Figura 31**. Los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia celular (%SDH) de acuerdo a la siguiente fórmula: porcentaje de supervivencia celular (%SDH) =  $100 (A1/A0)$ , donde la A1 es la absorbancia de las células expuestas a las AgNPs, y A0 es la absorbancia del control negativo (células no tratadas).

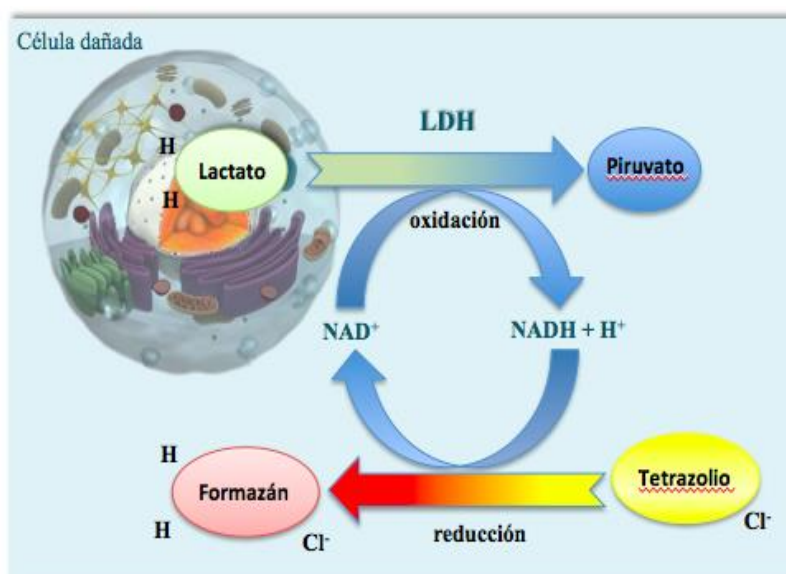
#### III.5.2. Método de la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH)

El método de la LDH es un ensayo colorimétrico basado en la detección de la actividad de la lactato deshidrogenasa (Bopp y Lettieri, 2008). La permeabilidad de la membrana plasmática es un parámetro que permite discriminar con facilidad entre células vivas y células muertas (Decker y Lohman-Matthes, 1988). Esto sucede tanto en las células que sufren muerte celular por necrosis como en los estadios más avanzados de apoptosis (Lobner, 2000).

La lactato deshidrogenasa es rápidamente liberada al sobrenadante del cultivo cuando las células están dañadas y han perdido la integridad de la membrana. El primer paso es la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}/\text{H}^+$  oxidando el lactato en piruvato catalizado por la enzima lactato deshidrogenasa tal como se muestra en la **Figura 32**, a continuación hay una transferencia de iones  $\text{H}/\text{H}^+$  del  $\text{NADH}/\text{H}^+$  a la sal de tetrazolio 2- (4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil) cloruro-5-feniltetrazolium (INT), que se reduce a formazán de color rojo (Weyermann y col., 2005). La solución coloreada resultante se cuantifica espectrofotométricamente ( $\lambda$  492nm). Un incremento en el número de células dañadas está directamente relacionado con la cantidad de formazán formado, reflejado en la absorbancia obtenida.

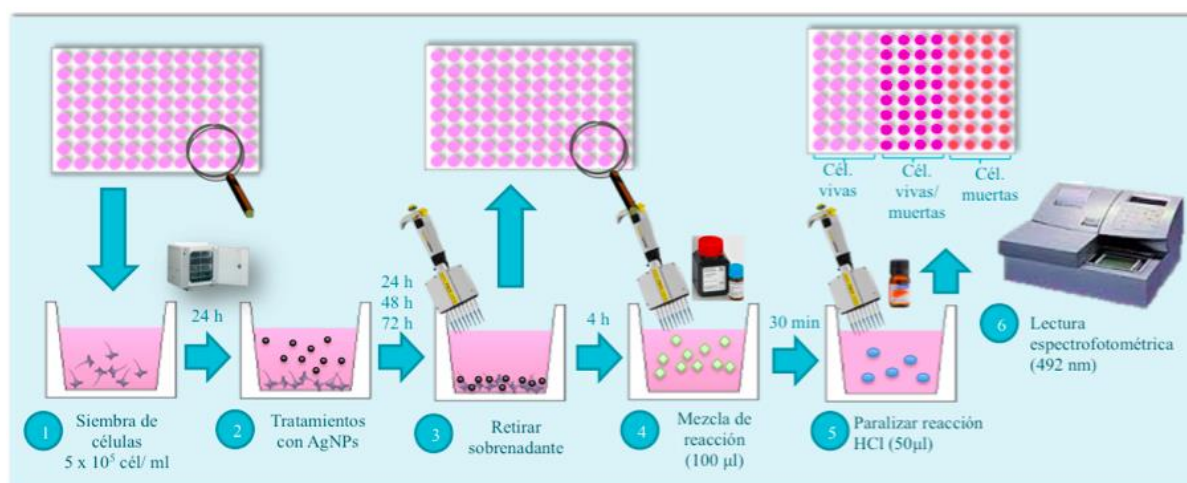


**Figura 31.** Procedimiento del método colorimétrico MTT.



**Figura 32.** Reacción de metabolización de lactato a piruvato y de tetrazolio a formazan, mediante la actividad de la enzima LDH en las células viables.

En este trabajo hemos utilizado el kit de detección de citotoxicidad (LDH) de Roche, para evaluar la citotoxicidad de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las cuatro líneas celulares, HepG2, HL-60, NHDF y HPF (**Artículos 1, 2, 3 y 4**). La liberación de LDH, se determinó siguiendo las indicaciones del kit de detección de citotoxicidad (LDH) (**Figura 33**). Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de LDH ( $\%LDH = 100(A_E - A_0)/(A_1 - A_0)$ ), donde  $A_E$  es la absorbancia de las células expuestas a las nanopartículas de plata,  $A_0$  es la absorbancia del control negativo (células no tratadas), y  $A_1$  es la absorbancia del control positivo (células tratadas con 2% Tritón).



**Figura 33.** Procedimiento del método de liberación de LDH.

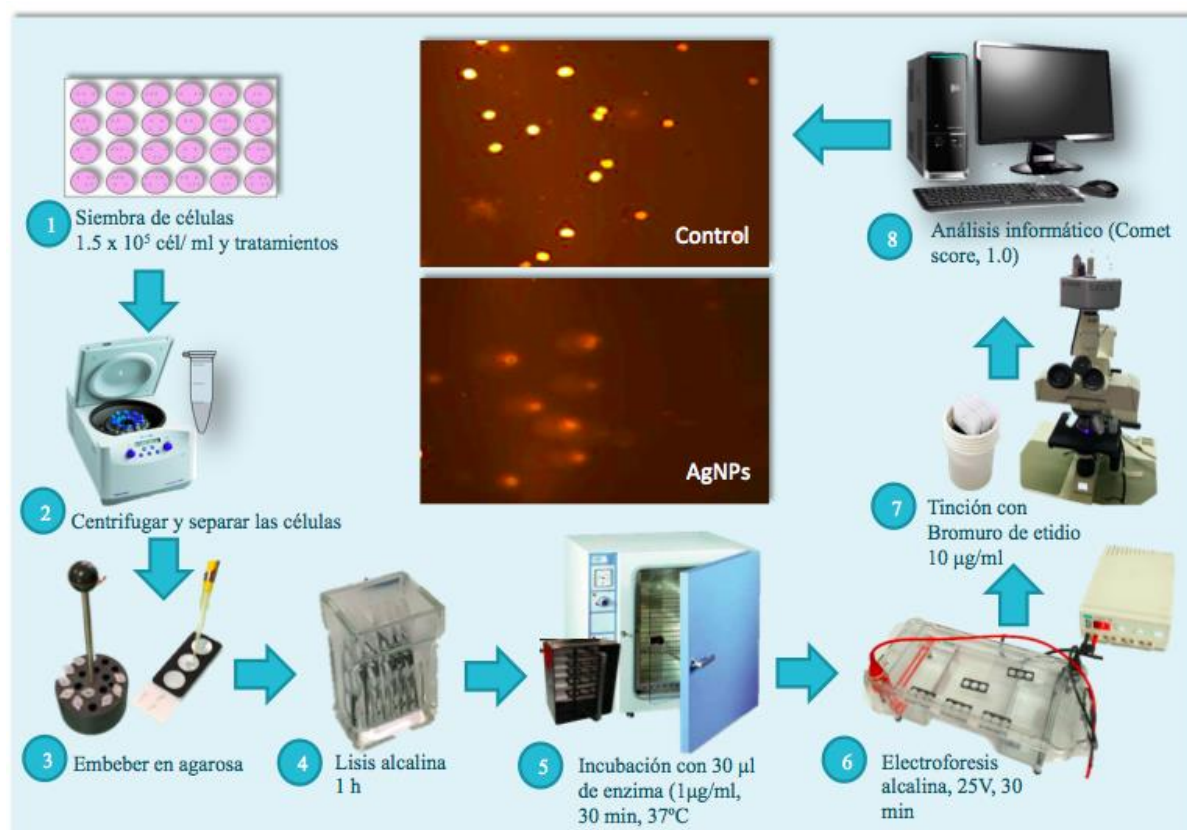
## III.6. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD

### III.6.1. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro*: electroforesis alcalina de células individuales (Ensayo Cometa)

La técnica de electroforesis alcalina en células individuales conocida también como ensayo Cometa es un método rápido y sencillo que permite detectar roturas de ADN de cadena simple y doble, sitios lábiles a los álcalis (apurínicos y apirimidínicos), así como roturas ocurridas durante el proceso de reparación por escisión (Karlsson, 2010). El principio del ensayo se basa en lisar células fijadas individualmente en una matriz de agarosa y someterlas a electroforesis para lograr que el ADN migre hacia el ánodo, semejando la cola de un cometa. La imagen que se forma comprende el ADN intacto (la cabeza) y las cadenas de ADN dañado (cola) que emigran del núcleo. Las imágenes del cometa sirven para



determinar el porcentaje de daño en el ADN, de manera que cometas con colas largas suponen un mayor número de roturas del ADN (**Figura 34**) (Petersen y Nelson, 2010).



**Figura 34.** Ensayo Cometa.

El ensayo Cometa se puede modificar para detectar daño oxidativo al ADN (purinas y pirimidinas oxidadas), mediante la incorporación de enzimas que intervienen en la reparación por escisión de bases. Para detectar purinas y pirimidinas oxidadas generalmente se utiliza la formamidopirimidina glicosilasa (Fpg) y la endonucleasa III (Endo III), respectivamente (Petersen y Nelson, 2010). La enzima FPG reconoce diversas purinas oxidas como la 8-oxo-7,8-dihidro-2-guanosina (8-oxo-G), que representa un importante daño genotóxico en las bases, y se considera como un indicador de daño oxidativo en las bases del DNA (Asare y col., 2012). Estas enzimas incrementan la especificidad y la sensibilidad del ensayo ya que reconocen daños en bases particulares y crean roturas adicionales en el ADN incrementando la cantidad de ADN migrado (Karlsson, 2010).

En el presente trabajo de investigación, utilizamos este ensayo para evaluar el daño al ADN (ruptura de las cadenas del ADN y daño oxidativo) inducido por las AgNPs de 4.7 y 42

nm en las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF (**Artículo 5**). El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo de Olive y col. (1992) aunque para una mejor una caracterización del origen de la ruptura de las cadenas del ADN se utilizaron las enzimas Fpg y Endo III. Los resultados se expresaron como porcentaje de ADN en cola. Se evaluaron las imágenes obtenidas de 50 células por cada tratamiento.

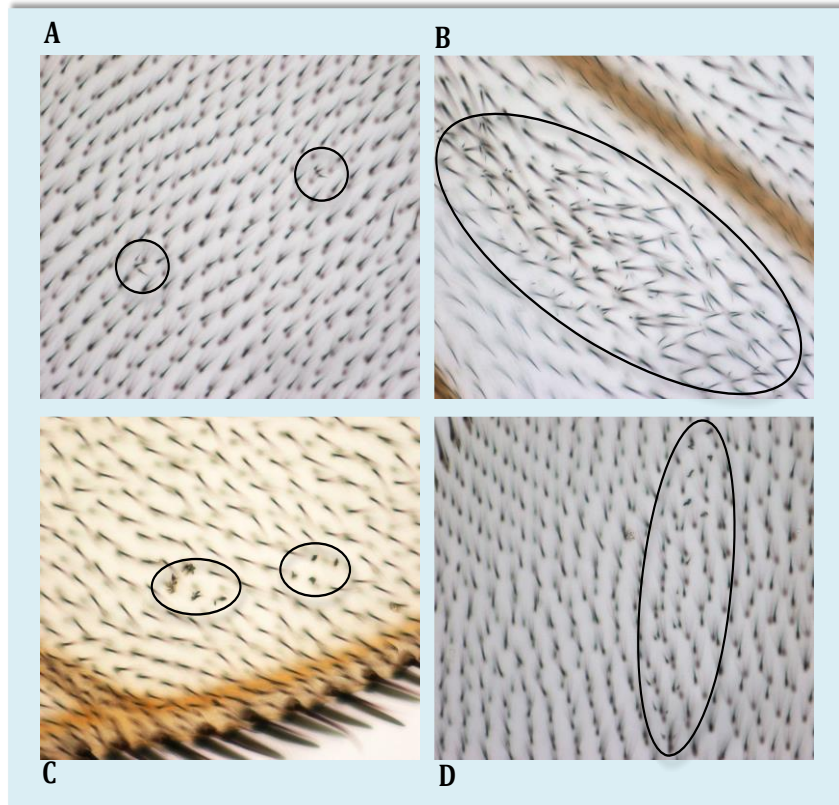
#### **III.6.2. Evaluación de la genotoxicidad *in vivo*: test de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila Melanogaster***

Los ensayos de mutación y recombinación somáticas en *D. melanogaster* son ensayos *in vivo* que permiten la detección rápida y barata de agentes genotóxicos. Se basan en la detección y cuantificación de eventos mutacionales y recombinacionales en células somáticas de un organismo eucariota.

Las células diana utilizadas en este ensayo son los discos imaginales, los cuales corresponden a los primordios celulares presentes en las larvas y que dan lugar a diferentes partes del cuerpo durante el proceso de pupación, en particular, las que dan origen al ala en el adulto. Este ensayo se basa en el principio de la pérdida de heterocigosidad de genes marcadores (*mwh* y *flr*<sup>3</sup>) en las células de los discos imaginales de las larvas, que pueden dar lugar a la formación de clones mutantes que se expresarán como sectores distinguibles por su aspecto fenotípico en las alas de los individuos adultos (**Figura 35**) (Graf y col., 1984). Esta prueba tiene la capacidad de detectar un amplio rango de sucesos mutacionales, incluidas la recombinación mitótica y la conversión génica. La capacidad de detectar la recombinación somática hace que sea de gran interés para la identificación de agentes potencialmente carcinogénicos, ya que se ha señalado que la recombinación mitótica puede ser un mecanismo importante en la pérdida de heterocigosidad en las células, un proceso que puede ser crucial para la carcinogénesis (Stettler y Sengstag, 2001; Wijnhoven y col., 2003; Wang y col., 2006).

En el presente trabajo de investigación, utilizamos este ensayo para evaluar el efecto genotóxico inducido por las AgNPs de 4.7 y 42 nm en *D. melanogaster* (**Artículo 6**). Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los principios y los procedimientos básicos descritos por Graf y col. (1984) y Würzler y Vogel (1986) (**Figura 36**). Cualquier aumento en la frecuencia del clon en comparación con el control refleja la actividad genotóxica (Graf

y col., 1984, 1998). La presencia de sectores simples indican la existencia de una mutación puntual, una alteración cromosómica, o la recombinación mitótica. Sin embargo, los sectores dobles derivan exclusivamente de la recombinación mitótica.



**Figura 35.** Tricomas de la parte dorsal de las alas de *D. Melanogaster*. **A.** Sectores simples pequeños *mwh*; **B.** Sector simple grande *mwh*; **C.** Sectores simples *flr<sup>3</sup>*; **D.** Sector doble.

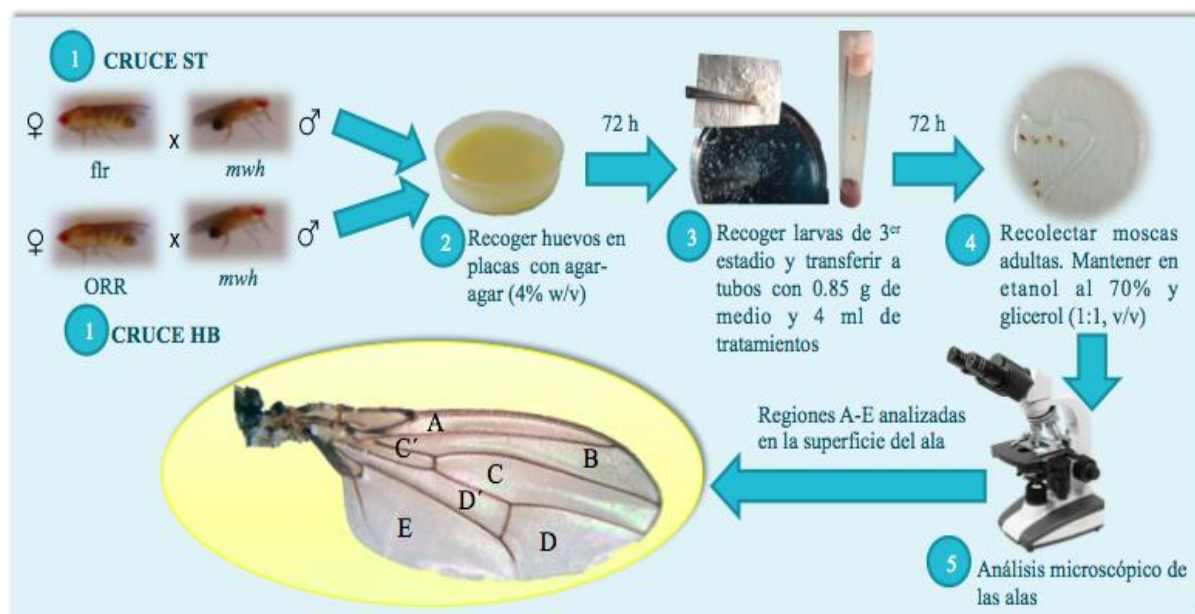
### III.7. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOXICIDAD DE LAS AgNPs

#### III.7.1. Determinación de la producción intracelular de las EROs: método del diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA)

El H<sub>2</sub>DCFDA es una sonda que se utiliza para detectar la actividad oxidativa intracelular. El H<sub>2</sub>DCFDA se hidroliza por esterasas intracelulares a diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF). La H<sub>2</sub>DCF no puede atravesar la membrana celular quedando atrapada en el interior de la célula, siendo rápidamente oxidada a dihidrofluoresceína (DCF), compuesto de alta

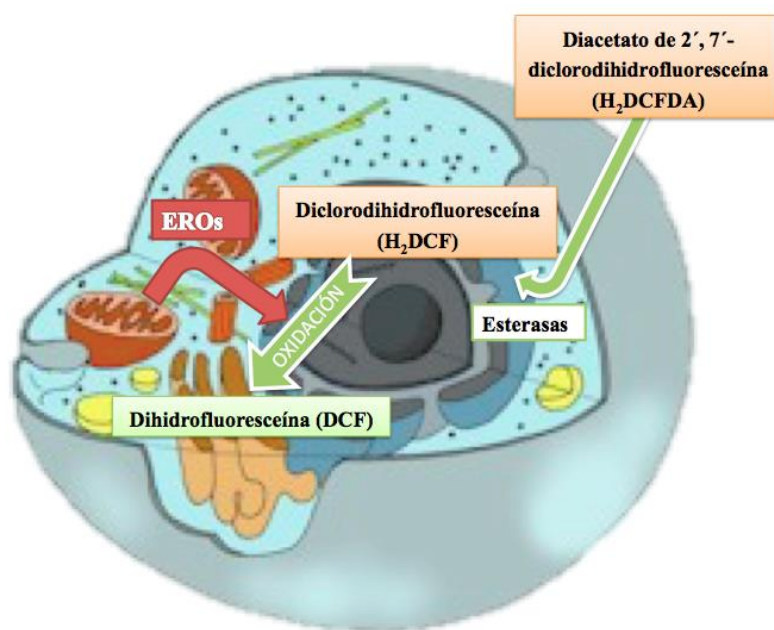


fluorescencia, en presencia de las EROs. La intensidad resultante es proporcional a la concentración intracelular de las EROs (LeBel y col., 1992; Zhu y col., 1994) (**Figura 37**).



**Figura 36.** Ensayo SMART en alas de *Drosophila melanogaster*.

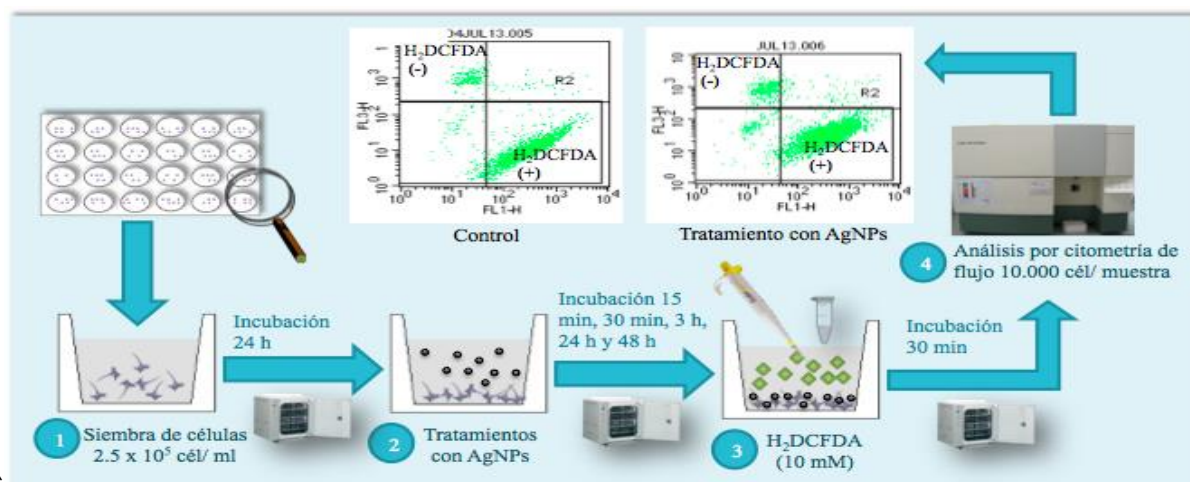
El H<sub>2</sub>DCFDA se utilizó para detectar la producción de las EROs inducida por las AgNPs 4.7 y 42 nm en las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF (**Artículos 2, 3 y 4**). Un resumen del procedimiento se muestra en la **Figura 38**.



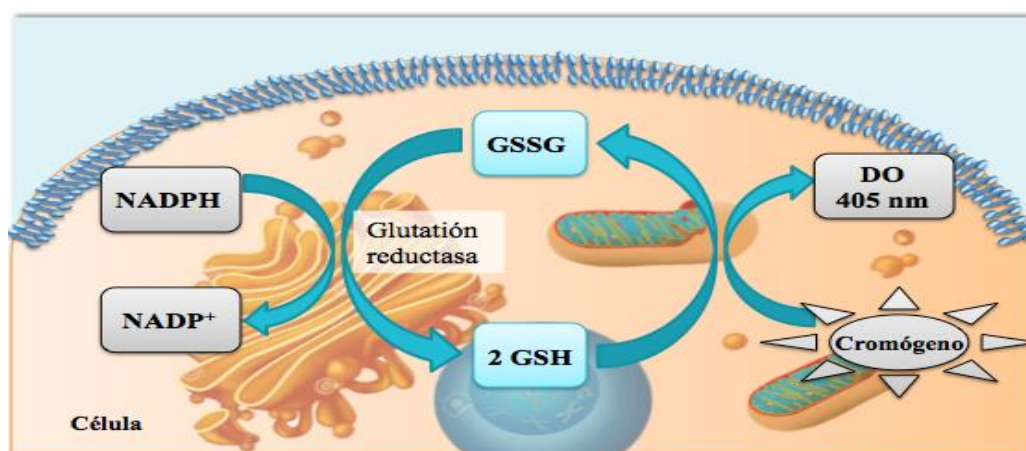
**Figura 37.** Hidrólisis del H<sub>2</sub>DCFDA por esterasas intracelulares a H<sub>2</sub>DCF, y su posterior oxidación a DCF en presencia de las EROs.

### III.7.2. Determinación del contenido total de glutatión (GSSG/GSH)

El glutatión (GSH) es un tripéptido no proteínico constituido por 3 aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina. El glutatión es el principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de las EROs como los radicales libres y los peróxidos (Pompella y col., 2003). La glutatión reductasa reduce el glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) en presencia de NADPH. Después, los reactivos cromógenos con el grupo tiol de la GSH producen un compuesto coloreado que absorbe a 405 nm (**Figura 39**). Los resultados obtenidos se calcularon comparándolos con una curva estándar predeterminada de glutatión. La tasa de producción de cromóforo es proporcional a la concentración de glutatión de la muestra.



**Figura 38.** Método del diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA).



**Figura 39.** Principio fundamental del ensayo OxiSelect total glutatión. Reducción de la GSSG a GSH por acción de la glutatión reductasa.

En este trabajo hemos utilizado el kit de ensayo colorimétrico OxiSelect total glutatión (GSSG / GSH) de Cell Biolab para evaluar si el estrés oxidativo interviene en la citotoxicidad de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las cuatro líneas celulares, HepG2, HL-60, NHDF y HPF (**Artículos 2, 3 y 4**). El contenido total de glutatión se determinó siguiendo las indicaciones del kit (**Figura 40**).

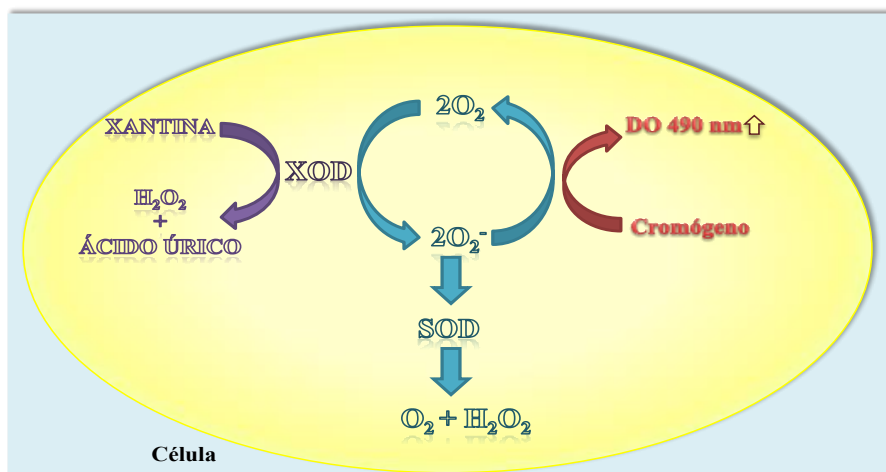


**Figura 40.** Procedimiento del método OxiSelect total glutatión (GSSG / GSH).

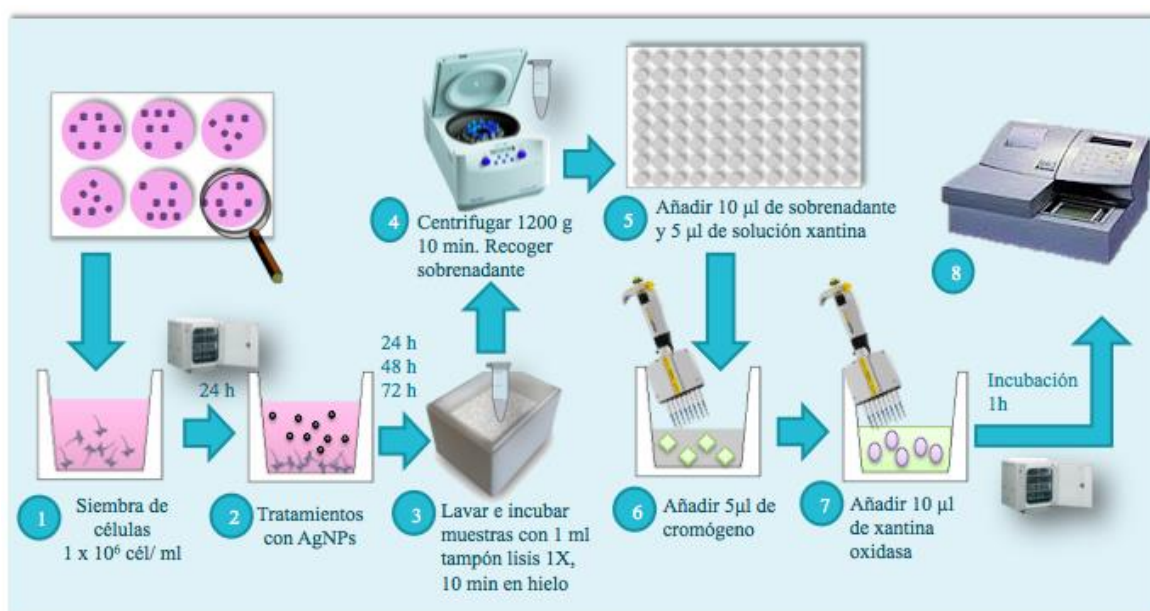
#### III.7.3. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La SOD cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (McCords y Fridovich, 1969). Debido a esto, la SOD es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. El ensayo empleado en este trabajo, utiliza un sistema xantina/ xantina oxidasa (XOD) para generar aniones superóxido, además se incluye un cromógeno que produce una sustancia coloreada de formazán soluble cuando se produce la reducción de los aniones superóxido. La actividad de SOD se determina como la inhibición de la reducción del cromógeno (**Figura 41**).

El kit OxiSelect Actividad de la SOD de Biolabs fue utilizado en este trabajo de investigación para evaluar si la actividad de la enzima SOD se ve afectada por las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF (**Artículos 2, 3 y 4**). Un esquema del procedimiento se muestra en la **Figura 42**.



**Figura 41.** Los aniones superóxido ( $O_2^-$ ) son generados por el sistema XOD. En presencia de SOD, estas concentraciones de aniones superóxido se reducen, dando señal menos colorimétrica.



**Figura 42.** Procedimiento del método OxiSelect Actividad de la superóxido dismutasa (SOD).

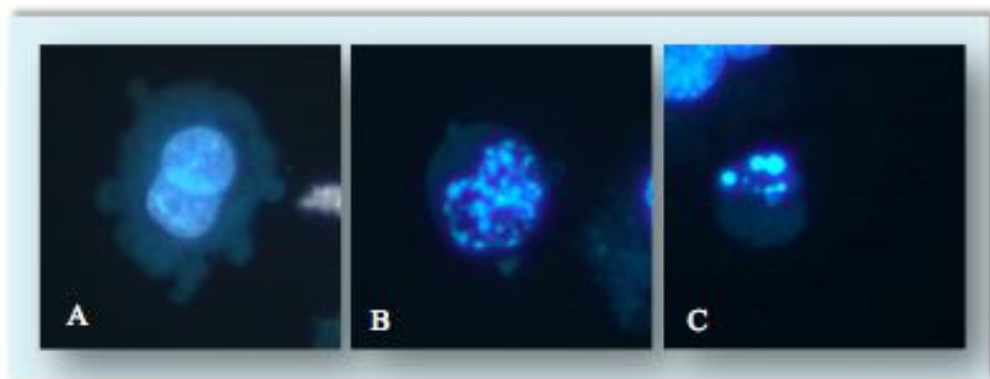
### III.7.4. Determinación de apoptosis

#### III.7.4.1. Detección morfológica de apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular donde las células sufren cambios morfológicos característicos. Estos cambios morfológicos pueden visualizarse al microscopio de



fluorescencia utilizando colorantes vitales que se unen al ADN (**Figura 43**). La emisión de una mayor intensidad de fluorescencia indica una condensación de la cromatina, característica del proceso de apoptosis (Ulukaya y col., 2011).



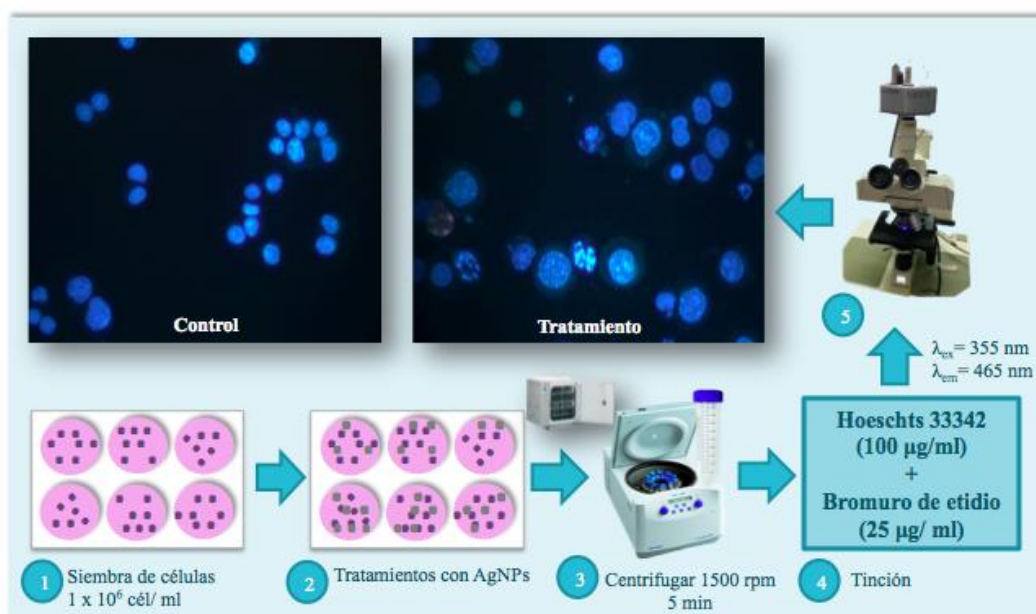
**Figura 43.** Características morfológicas de apoptosis: (A) burbujeo de la membrana o “blebbing”; (B) condensación de la cromatina; y (C) formación de cuerpos apoptóticos.

En el presente trabajo de investigación hemos utilizado el colorante vital Hoechts 33342 combinado con bromuro de etidio para la detección de células apoptóticas en las líneas celulares HepG2 y HL-60 tras los tratamientos con AgNPs de 4.7 y 42 nm (**Artículo 7**) (**Figura 44**). El bromuro de etidio sólo difunde al interior de la célula cuando la membrana plasmática pierde su integridad, indicando que la célula está necrótica o se encuentra en las etapas tardías de la apoptosis. Por tanto, las células necróticas van a adquirir un color rosa debido a la unión del bromuro de etidio con el DNA, mientras que las células viables o apoptóticas emiten una fluorescencia azul por la unión del Hoechst 33342 al material nuclear. Las células apoptóticas se diferencian de las células viables por la morfología del núcleo, que aparecerá condensado, fragmentado y con una mayor intensidad de la fluorescencia azul (Jerome y Chen, 2000). Se estudiaron 200 células por cada tratamiento diferenciando entre células viables, necróticas y apoptóticas.

#### **III.7.4.2. Cuantificación de apoptosis mediante el ensayo Anexina V/IP**

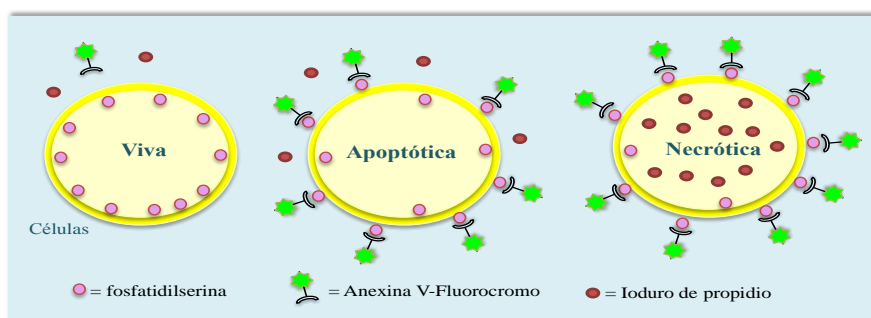
La Anexina-V es una proteína que se une específicamente a los fosfolípidos cargados negativamente como es la fosfatidilserina (FS), la cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. Durante las fases iniciales de la apoptosis se producen cambios en la superficie celular, uno de éstos es la exposición de la FS en la cara externa de la membrana

plasmática el cual se puede cuantificar mediante citometría de flujo utilizando la Anexina V conjugada con fluorocromos (**Figura 45**). Debido a que la FS también se encuentra en la cara externa de las células necróticas (Krysko y col., 2004), se emplea la tinción de ioduro de propidio (IP). El IP, puede acceder al núcleo de las células necróticas, que tienen dañada la membrana plasmática, y unirse al DNA. Por tanto, si la Anexina V conjugada con un fluorocromo se utiliza de forma conjunta con el IP, se pueden distinguir las células apoptóticas de las necróticas y de las viables (Vermes y col., 1995).

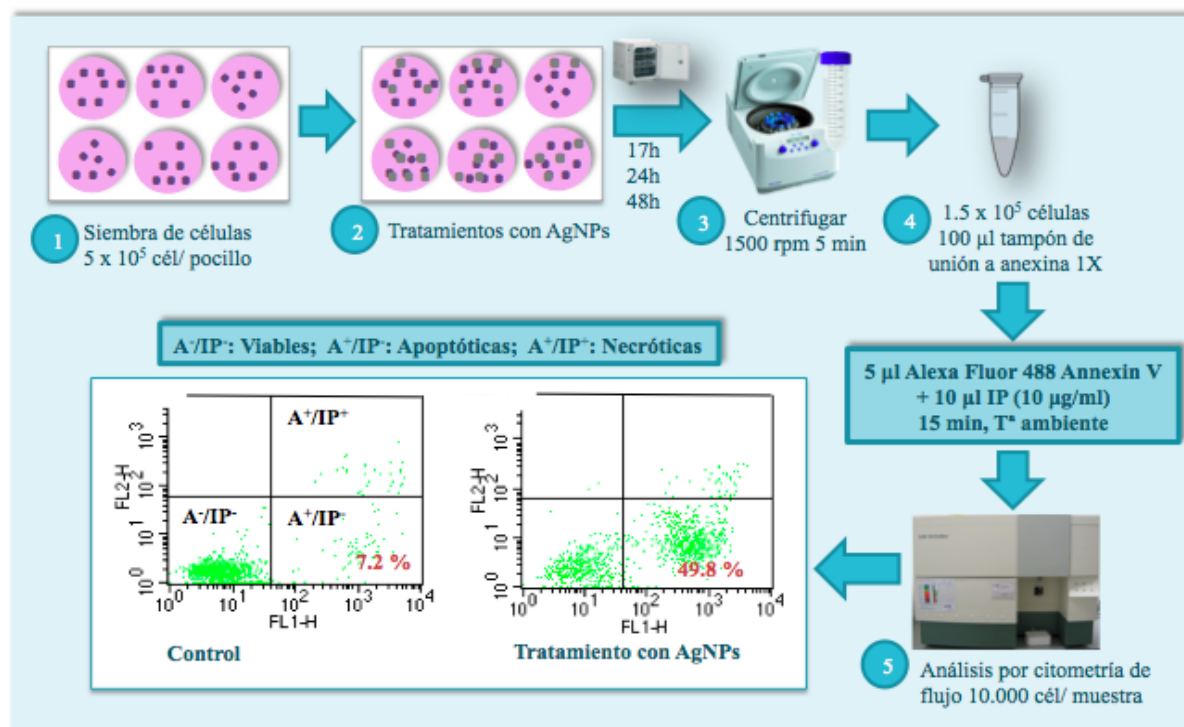


**Figura 44.** Detección morfológica de apoptosis.

En este trabajo de investigación utilizamos el ensayo Anexina V/IP para determinar el porcentaje de células HL-60 apoptóticas tras el tratamiento con las AgNPs de 4.7 y 42 nm (**Artículo 7**). Un resumen del procedimiento del método se muestra en la **Figura 46**.



**Figura 45.** Detección de la fosfatidilserina (FS) por el ensayo Anexina V/IP.

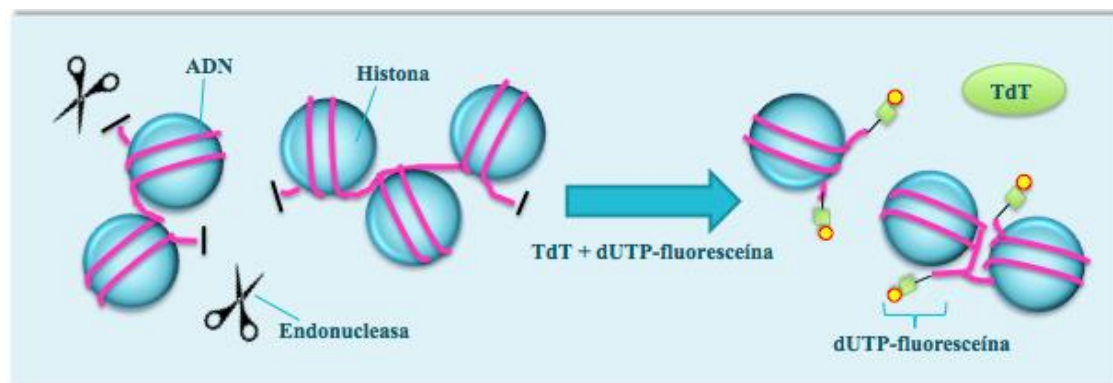


**Figura 46.** Ensayo Anexina V/IP.

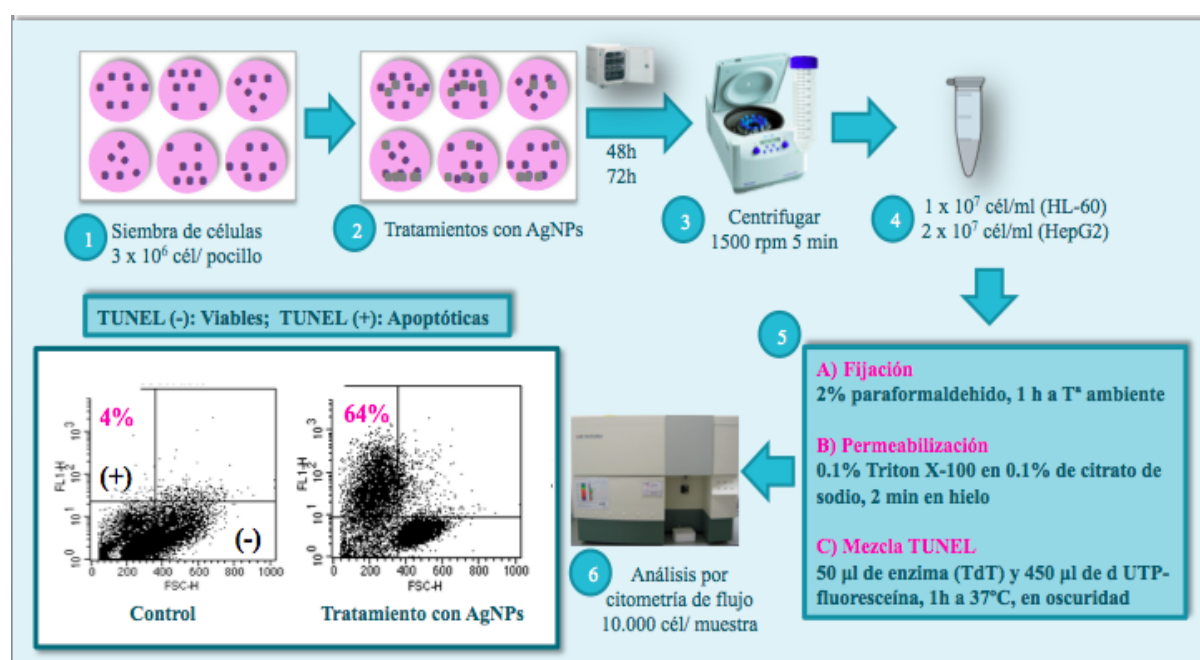
#### III.7.4.3. Cuantificación de apoptosis mediante el método TUNEL

El método de marcaje de los extremos 3'-OH libres del ADN (terminal deoxinucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling, TUNEL) descrito por Gavrieli y col. (1992) está considerado como el más sensible y específico para la cuantificación de las células apoptóticas, y su diferenciación con las necróticas. Este método se basa en la detección de la fragmentación de ADN debida a cascadas de señalización apoptóticas (Lozano y col., 2009). Una vez fijadas y permeabilizadas las células, se incuban con la mezcla TUNEL que contiene la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT) y los nucleótidos modificados (dUTP-fluoresceína). Durante este período de tiempo, la enzima TdT cataliza la incorporación de los dUTP modificados a los extremos 3'-OH libres del ADN celular (**Figura 47**). La fluorescencia incorporada en los lugares dañados del ADN se cuantifica utilizando un citómetro de flujo.

En este trabajo de investigación utilizamos el método TUNEL para determinar el porcentaje de células HepG2 y HL-60 apoptóticas tras el tratamiento con las AgNPs de 4.7 y 42 nm (**Artículo 7**). El método se realizó acorde con las indicaciones del Kit In Situ Cell Death Detection, Fluorescein de Roche (**Figura 48**).



**Figura 47.** Incorporación de los nucleótidos dUTPfluoresceína a los extremos 3'-OH libres del DNA por la acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT).



**Figura 48.** Ensayo TUNEL.

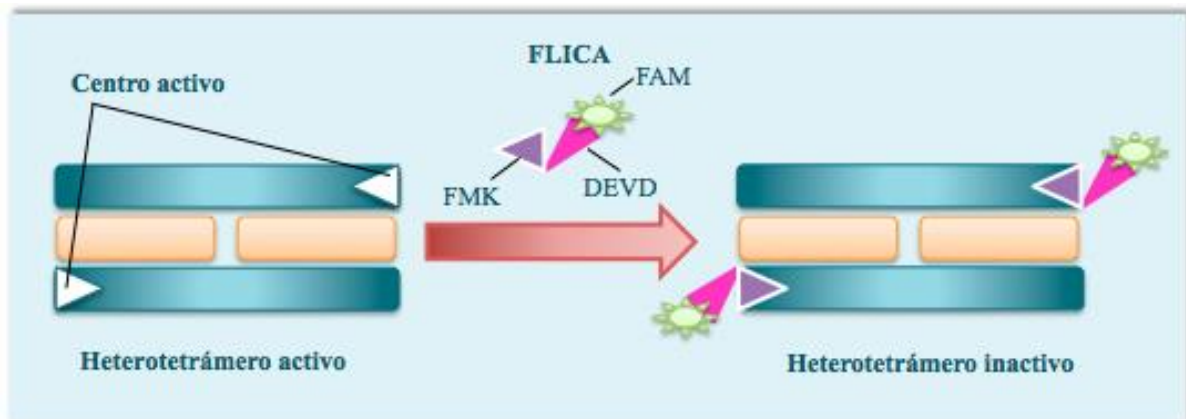
#### III.7.4.4. Medida de la activación de las caspasas

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una gran diversidad de estímulos (Thornberry y Lazebnik, 1998). En el presente trabajo de investigación se ha empleado el kit Vybrant™ FAM caspasa-3 y -7 para detectar la activación de las caspasas -3 y -7 tras el tratamiento con las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las células HepG2 y HL-60 (**Artículo 7**).

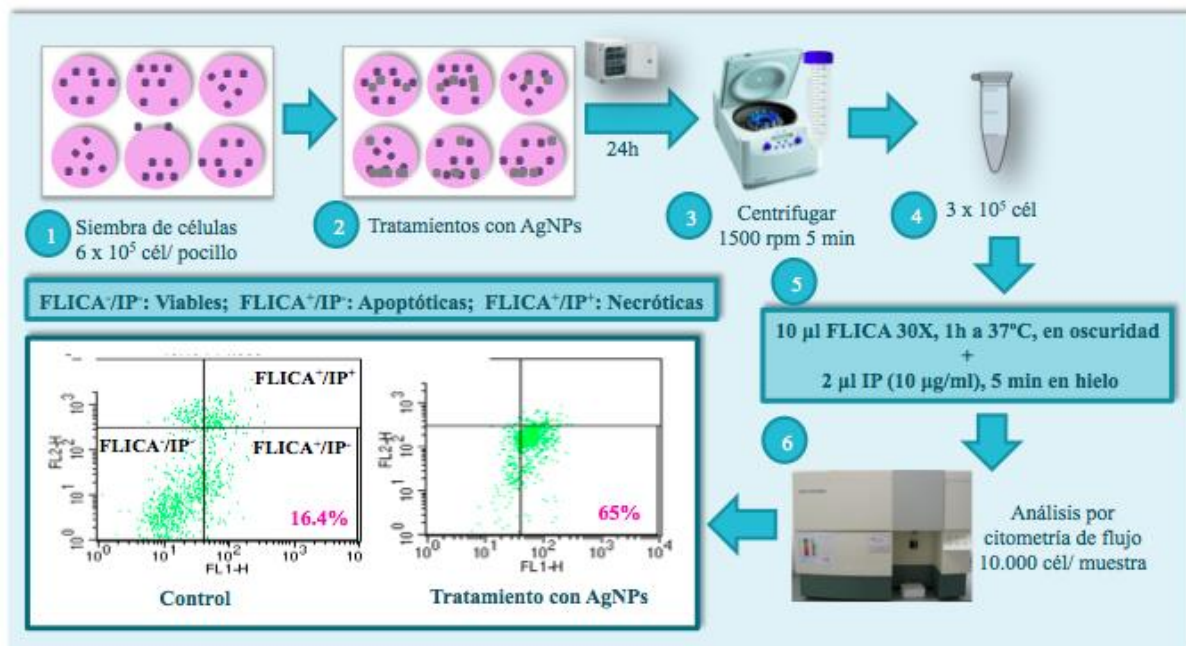
El método se basa en la detección de las caspasas -3 y -7 activas a través de un inhibidor fluorescente (FLICA). FAM-DEVD-FMK es un sustrato sintético, permeable a la



membrana y no citotóxico, el cual está conformado por tres compuestos: un grupo de carboxifluoresceína (FAM) que está conjugado con el péptido DEVD (aspartil-glutánil-valil-aspartato, DEVD) que es la secuencia reconocida por las caspasas -3 y -7 activas y una fluorometilcetona (FMK) que se asocia covalentemente con el sitio de las caspasas (**Figura 49**). La señal fluorescente verde resultante es la medida directa de la cantidad de caspasas -3 y -7 activas que están presentes en el momento en que se añade el inhibidor. La **Figura 50** muestra un resumen del procedimiento del método.



**Figura 49** . Mecanismo de acción del reactivo de FLICA.



**Figura 50.** Detección de caspasas activas.

### **III.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados de esta Tesis Doctoral representan la media y el correspondiente error estándar de tres ensayos independientes (cada uno de ellos por triplicado). La comparación estadística se realizó con la t- de Student y se consideraron diferencias significativas cuando sus medias mostraron una  $p \leq 0,05$ . Para el análisis de los datos se empleó el software Statgraphics Plus 5.0.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el ensayo SMART se realizó usando el test de multiple decisión (Selby y Olson, 1981; Frei y Würzler, 1988), que se basa en la prueba binomial y la prueba de la chi cuadrado (criterio de K. Pearson) (Kastenbaum y Bowman, 1970; Margolin y col., 1983).



## CAPÍTULO IV

### *Resultados*



# Artículo I

---

***In vitro* evaluation of silver nanoparticles on human  
Toxicology Mechanisms and Methods (2013), 23: 153-160**





## RESEARCH ARTICLE

## *In vitro* evaluation of silver nanoparticles on human tumoral and normal cells

Alicia Ávalos Fúnez, Ana Isabel Haza, Diego Mateo, and Paloma Morales

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

**Abstract**

Silver nanoparticles (AgNPs), which have well-known antimicrobial properties, are extensively used in various medical and general applications. Despite the widespread use of AgNPs, relatively few studies have been undertaken to determine the toxicity effects of AgNPs exposure. The aim of the present work was to study how AgNPs interact with four different human cell lines (hepatoma, leukemia, dermal and pulmonary fibroblast) in order to understand the impact of such nanomaterials on cellular biological functions. For toxicity evaluations, mitochondrial function (MTT assay) and membrane leakage of lactate dehydrogenase (LDH assay) were assessed under control and exposed conditions (24, 48 and 72 h of exposure). Furthermore, we evaluated the protective effect of *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) against AgNP-induced cytotoxicity. Results showed that mitochondrial function decreased in all cell lines exposed to AgNPs at 6.72–13.45 µg/ml. LDH leakage also increased in all cell lines exposed to AgNPs (6.72–13.45 µg/ml). However, the cytotoxic effect of AgNPs (13.45 µg/ml) was prevented by pretreatment of different concentrations of NAC (1–20 mM). Our findings indicate that AgNPs are cytotoxic on human tumor and normal cells, the tumor cells being more sensitive to the cytotoxic effect of AgNPs. In addition, NAC protects human cells from cytotoxicity of AgNPs, suggesting that oxidative stress is in part responsible of this effect.

**Keywords**
 Lactate dehydrogenase assay, MTT assay, *N*-acetyl-L-cysteine, nanoparticles
**History**
 Received 11 July 2012  
 Revised 19 December 2012  
 Accepted 19 December 2012  
 Published online 28 January 2013
**Introduction**

Nanomaterials are generally defined as having one or more external dimensions or an internal or surface structure on the nanoscale (about 1–100 nm) (Landsiedel et al., 2009). Materials at this scale typically exhibit nanostructure-dependent properties, such as unique physical properties (optical, electrical and magnetic) and highly chemical reactivity, which make them more attractive for commercial and medical applications (Oberdörster et al., 2005). Therefore, the field of nanotechnology is expanding at a rapid rate, due to the benefits promised by the incorporation of nanomaterials into products (Johnston et al., 2010).

Currently, the inventory of consumer products indicates 1317 products containing nanomaterials ([www.nanotechproject.org/Inventories](http://www.nanotechproject.org/Inventories)), for example products for electronics, computers, textiles, food industry and for applications in medicine (Cheng et al., 2004; Cohen et al., 2007). Specifically, in the food industry it is applied in areas such

as food quality and safety, development of new food and packaging (Almengor, 2009). Furthermore, in future year nanotechnology will have a commercial implementation in four main areas: smart packaging, nanodevices, ingredients and additives (Pray & Yaktine, 2009).

However, the same characteristic making nanoparticles (NPs) so attractive for their exploitation in new products have led to concerns that NPs may pose a risk for humans and the environment (Beer et al., 2012). So, an improved understanding of the potential risks, comprising of exposure and hazard assessments, associated with exposure to nanomaterials is necessary (Maynard et al., 2006) to check its toxicity or safety. Although there have been quite a number of toxicological studies published on NPs, it is still difficult to draw definite conclusions about their toxicity as a number of studies have been performed without thorough characterization and description of the investigated NPs and the solutions used under experimental conditions. This is also reflected in an opinion published by the European Commission Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR, 2006, 2009) who concluded from the existing studies, that NPs might have different toxicological properties from the bulk substance, but their risks should be assessed on a case-by-case basis.

Address for correspondence: Paloma Morales, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28080, Spain. Tel: +34 91 3943747. Fax: +34 91 3943743. E-mail: pmorales@vet.ucm.es



The main feature of these nanomaterials is: they possess a higher surface-to-volume ratio compared to bulk materials, and thus have an enhanced contact area with their surroundings than do bulk materials at the same mass (Maurer-Jones et al., 2010). This could mean that catalytic or other active sites on the particle surface are exposed, in some cases inducing the formation of reactive oxygen species (ROS) (Barnard & Xu, 2008). Due to their small size, NPs are retained in many cells and organs to a larger extent than are larger particles (Porter et al., 2009). Also, in comparison with unstructured bulk material, the shape of NPs can play a crucial role in a determining response (Albanese et al., 2010).

Ag is well known for its antimicrobial activity, and the  $\text{Ag}^+$  ion is generally recognized as a bioactive species (Stickler, 2000), therefore silver nanoparticles (AgNPs) are one of the most commonly used nanomaterials (Piao et al., 2011). Recently, AgNPs have been used in many commercial products, such as deodorants, clothing materials, and also in cleaning solutions and sprays (Kumari et al., 2009). Additionally, AgNPs have been used to prevent bacterial colonization on various surfaces such as catheters and prostheses (Foldbjerg et al., 2009). Therefore, although a large and growing number of applications exist for AgNPs, there is a serious lack of information on the mechanisms by which they act, and consequently their implications for human health (Rosas-Hernández et al., 2009). Recent studies have shown that AgNP accumulation in the liver could induce cytotoxicity via oxidative cell damage (Hsin et al., 2008; Hussain et al., 2005; Kim et al., 2009).

Food packaging makes up the largest share of current and short-term predicted markets of the use of nanotechnology in the food sector. The addition of NPs into shaped objects and films has been shown to improve properties of the packaging materials with regard to durability, temperature resistance, barrier properties and recycling properties (Xu et al., 2006). There are currently food contact nanosilver available in the market (food containers with nanosilver for antimicrobial action). One of the risk of exposure may arise from potential migration of NPs from food packaging (The Government of the Hong Kong Special Administrative Region, 2010). Therefore, EFSA proposes to consider case by case. This fact justifies the importance of assessing the toxicity of AgNPs.

The exposure to AgNPs could occur through the air, skin, food and the use of medical devices (Oberdorster et al., 2005). Thus, it is important to investigate the toxicity of AgNPs in relevant human tissues. The main goal of the present work was to study how AgNPs interact with four different human cell lines (hepatoma, leukemia, dermal and pulmonary fibroblast) in order to understand the impact of such nanomaterials on cellular biological functions.

In our study, human hepatoma cells (HepG2) have been used because the liver is a primary site of AgNP accumulation following exposure (Johnston et al., 2010). AgNPs have recently been studied in terms of drug delivery which would involve intravenous application (Boucher et al., 2008). Thus, it is crucial to investigate the effect of AgNPs on blood cells. In this study, we used a tumoral human leukemia cell line (HL-60). Additionally, normal human dermal fibroblast (NHDF) and human pulmonary fibroblast (HPF) cell lines have been used to consider the implication of dermal

exposure to AgNPs (due to the exploitation of these particles within wound dressings), and to evaluate the pulmonary toxicity of AgNPs we often focus on the response of epithelial cells that line the airways or alveoli (due to their prominent role in particle clearance) (Johnston et al., 2010).

The studies were done in parallel on tumoral and non-tumoral cells to determine the cytotoxic responses in the normal cells and to see if the potential toxic effects of the nanomaterials can be used to kill cancer cells.

## Materials and methods

### Chemicals

All chemicals were of reagent grade or higher and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise specified. Water-based solutions of naked AgNPs stabilized with a citrate of 157 nm in diameter (data reported by the manufacturer), pH 8.1 and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) were purchased from Sigma-Aldrich (.). Stock solutions of AgNPs were diluted to the required concentrations using the respective cell culture medium.

### Particle characterization

The particle size was characterized using transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). AgNPs solutions were sonicated (Branson 2510 water-bath, Branson Ultrasonic Corp., Danbury, CT; 40 kHz) for 30 min and then a drop of aqueous AgNP solution was placed onto a carbon-coated copper grid, air-dried and observed with TEM (JEOL, JEM 2100, Carl Zeiss, Jena, Germany) from Centro de Microscopía Electrónica, Complutense University, Madrid, Spain. In addition, AgNPs were observed after incubation in cell-free culture media (0.2% v/v) for 24 h at 37 °C. Image J software (National Institutes of Health, USA) was used to measure the NPs. The size of particles and agglomerates in the cell medium was measured by DLS using a Zetasizer nano ZS (Malvern, UK), from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain. The method yields a hydrodynamic diameter, which is the calculated particle diameter of a sphere that has the same measured motion in the solute as the actual particle.

### Cell culture

Tumoral human leukemia cells (HL-60) and human hepatoma cells (HepG2) were obtained from the Biology Investigation Centre Collection (BIC, Madrid, Spain). HL-60 cells were maintained in RPMI 1640 Medium and HepG2 cells were cultured as monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium. The media were supplemented with 10% v/v heat-inactivated fetal calf serum, 50 µg/ml streptomycin, 50 UI/ml penicillin and 1% v/v L-glutamine. Culture medium and supplements required for the growth of the human tumoral cell lines were purchased from GIBCO (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD).

NHDF and HPF were purchased from commercial PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany). NHDF and HPF were cultured as monolayer in fibroblast basal medium supplemented with 2% v/v fetal calf serum, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor and 5 µg/ml of insulin. Culture

medium and supplements were purchased from PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany). All human cell cultures were incubated at 37°C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

#### Cytotoxicity endpoints

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction and lactate dehydrogenase (LDH) leakage were used as parameters for cytotoxicity assessment. MTT is based on the mitochondrial reduction of tetrazolium salt (MTT) into an insoluble formazan product by succinic dehydrogenase. The assay was assessed according to the manufacturer's instructions (Cell Proliferation Kit I, Roche, Indianapolis, IN). Briefly, HepG2 cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml), NHDF ( $5 \times 10^5$  cells/ml) and HPF ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were plated onto multiwell systems and incubated for 24 h. After seeding, 100 µl of different concentrations of AgNPs (0.82–13.45 µg/ml) or negative controls (without AgNPs) were added to the wells, and plates were incubated for 24, 48 and 72 h at 37°C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The optical density of each well was read at 620 nm (test wavelength) and 690 nm (reference wavelength) by an ELISA with a built-in software package for data analysis (iEMS Reader MF, LabSystems, Helsinki, Finland). In experiments with HL-60 cells, the plates were incubated with  $1 \times 10^6$  cells/ml in complete culture medium and 50 µl of various concentrations of AgNPs were added to each well (0.82–13.45 µg/ml). Plates were then incubated for different times 24, 48 and 72 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> and then proceeded as described above.

Values presented in this paper are mean ± SEM. The percentage of cell survival (% SDH) is defined as the ratio of the number of cells in the presence of AgNPs to the number in the absence of AgNPs; it is defined by the following relationship: % SDH activity =  $(A_1/A_0) \times 100$ , where  $A_1$  is the absorbance of the cells exposed to the AgNPs and  $A_0$  is the absorbance of the negative control. All the concentrations were tested in 12 replicates and the experiments were repeated thrice.

Membrane integrity was assessed by measuring extracellular LDH according to the procedures described in manufacturer's instructions (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche, IN). The method is based on the loss of intracellular LDH and its release into the culture medium indicating irreversible cell death due to cell membrane damage. Briefly, HepG2, NHDF and HPF cells were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml culture

medium. 24 h after seeding, 100 µl of different concentrations of AgNPs (0.82–13.45 µg/ml) or negative and positive controls were added to the wells and the plates were incubated for 24, 48 and 72 h at 37°C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cell-free culture media was collected from each well and incubated with a reaction mixture for 30 min. The plates were read with a microplate reader at 490 nm. A solution of 2% Triton X-100, which lead to 100% cytotoxicity through cell lysing and thus to maximum LDH leakage, was used as a positive control. In the assays with HL60 cell line, the plates were incubated with  $5 \times 10^5$  cells/ml in a culture medium and 100 µl of different concentrations of AgNPs were added to each well (0.82–13.45 µg/ml). Plates were then incubated for different times of 24, 48 and 72 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> and then proceeded as described above.

The percentage of LDH leakage was calculated as follows: LDH leakage (%) =  $(\text{experimental value} - \text{untreated control}) / (\text{positive control} - \text{untreated control}) \times 100$  and represent the mean of three different experiments, each using 12 replicates per concentration.

#### Effect of NAC in AgNP-derived cytotoxicity

NAC is an important antioxidant and serves as a precursor for the synthesis of glutathione (Nel et al., 2006). The protective effect of NAC against AgNPs-induced cytotoxicity was evaluated using the MTT assay. Briefly, HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells were pretreated for 2 h with NAC at different concentrations (1, 5, 10 and 20 mM) prior to a 24 h treatment with AgNPs (13.45 µg/ml). Then, the procedure is equal to the MTT assay described above.

#### Statistical analysis

The Student's *t*-test was used for statistical comparison and differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ . Descriptive and graphical methods were used to characterize the data. All tests were performed with the software package Statgraphics Plus 5.0 (Statpoint Technologies, Inc, Warrenton, Virginia).

### Results

#### Particle characterization

As observed by TEM, most of the AgNPs were ovals and approximately 30–123 nm in diameter in aqueous solution (Figure 1A) and the particles formed agglomerates after

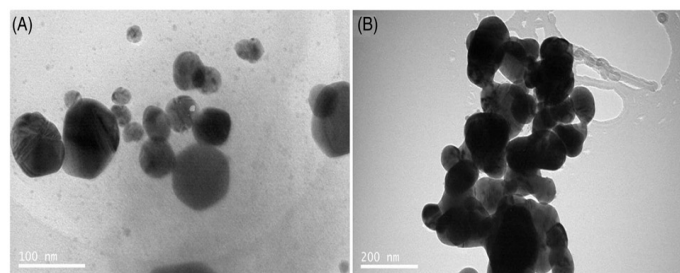


Figure 1. Representative TEM images of AgNPs. The AgNPs were dispersed in aqueous solution (panel A). Panel B is an image of AgNPs after 24 h incubation in cell-free culture media. Scale bars represent 100 nm in panel A and 200 nm in panel B.

incubation in cell-free culture media (Figure 1B). The size distributions of particles suspended in supplement cell medium, measured by DLS analysis, showed larger values than the particles size measured by TEM. AgNPs in cell culture media showed an average diameter of 191 and 216 nm, respectively.

#### Effect of AgNPs on cellular viability

Two cytotoxicity markers, MTT and LDH leakage were used to evaluate the effects of AgNPs on cellular viability. The results of the MTT viability assay showed a significant decrease in the mitochondrial function of HepG2 cells exposed to AgNPs for 48 and 72 h at a concentration of 13.45 µg/ml (42% and 7% of cell survival, respectively) (Figure 2). HepG2 cell treatment with AgNPs resulted in a dose-dependent increase of LDH leakage into culture media, signifying an AgNP-induced compromise of plasma membrane integrity. Similar to the MTT results, AgNPs (13.45 µg/ml) increased dramatically the percentage of LDH leakage after 48 and 72 h (50% and 95%, respectively).

Effect of AgNPs on HL-60 cell viability by MTT and LDH assays is shown in Figure 3. Data obtained by MTT assay revealed that AgNPs induced significant dose- and time-dependent inhibition on cell growth in HL-60 cell line.

The highest inhibition of HL-60 cell growth was found after treatment with 13.45 µg/ml AgNPs for 24, 48 and 72 h (60%, 46% and 42% of cell survival, respectively). In parallel, results obtained by LDH assay showed that the percentage of LDH released was lower than 27% at concentrations ranging from 0.82 to 6.72 µg/ml and all times of incubation. However, HL-60 cell treatment with 13.45 µg/ml of AgNPs for 24, 48 and 72 h, increased LDH leakage into culture media (42%, 60% and 64%, respectively).

Figure 4 shows the effect of AgNPs on NHDF cell viability by MTT and LDH assays. The highest inhibition of NHDF cell growth was found after treatment (MTT assay) with 13.45 µg/ml AgNPs for 24, 48 and 72 h of incubation (60% of cell survival). Similar results were obtained by the LDH assay. The percentage of LDH released increased to 36% at the concentration of 13.45 µg/ml AgNPs and all times of incubation.

The results of HPF cell treatment with AgNPs, using the MTT assay (Figure 5), showed a more pronounced reduction of cell survival at concentrations of 6.72 and 13.45 µg/ml after 72 h of treatment (64% and 34% of cell viability, respectively). In the LDH assay, concentrations of 6.72 and 13.45 µg/ml for 72 h showed the highest percentage of LDH released (41% and 63% of LDH leakage, respectively).

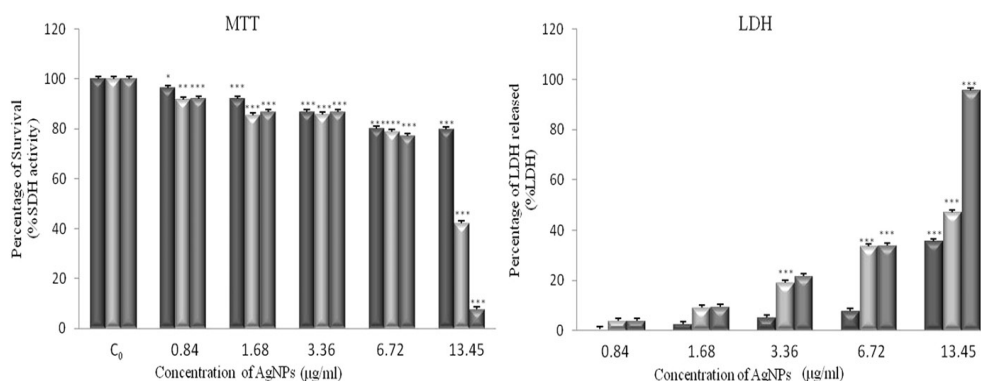


Figure 2. Effects of AgNPs 157 nm on HepG2 cell viability by MTT and LDH assays. Cells were cultured with different concentrations of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 h (▨). C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \* $p \leq 0.05$ .

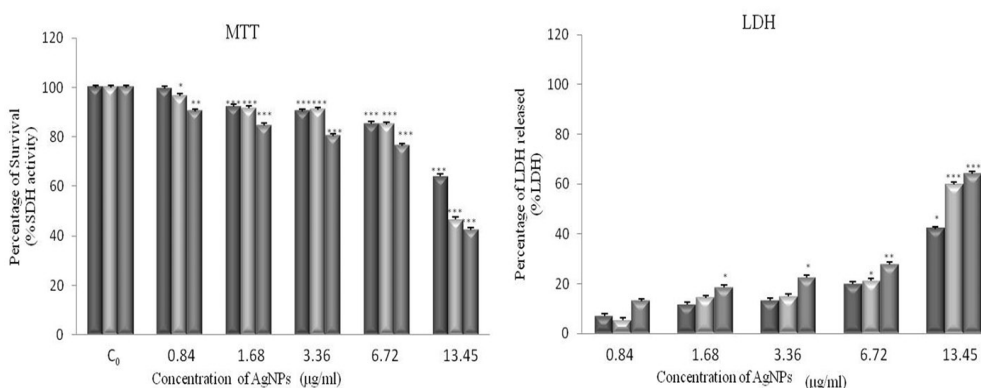


Figure 3. Effects of AgNPs 157 nm on HL60 cell viability by MTT and LDH assays. Cells were cultured with different concentrations of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 h (▨). C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \* $p \leq 0.05$ .

DOI: 10.3109/15376516.2012.762081

Silver nanoparticles impact on human cells 157

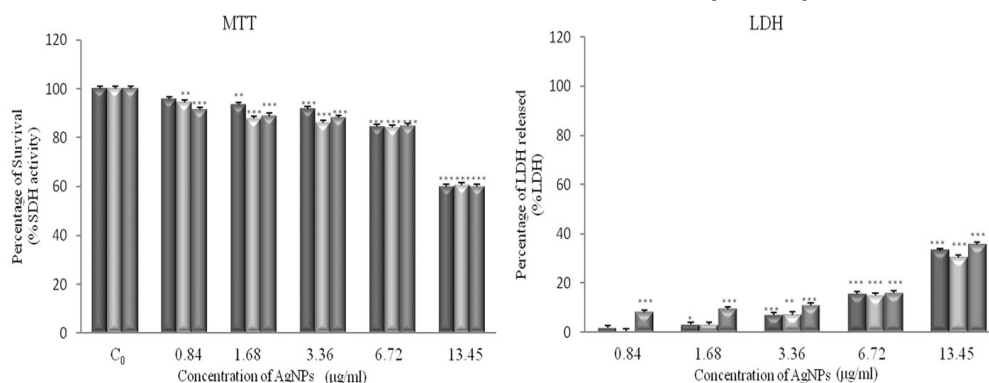


Figure 4. Effects of AgNPs 157 nm on NHDF cell viability by MTT and LDH assays. Cells were cultured with different concentrations of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 h (▨). C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \* $p \leq 0.05$ .

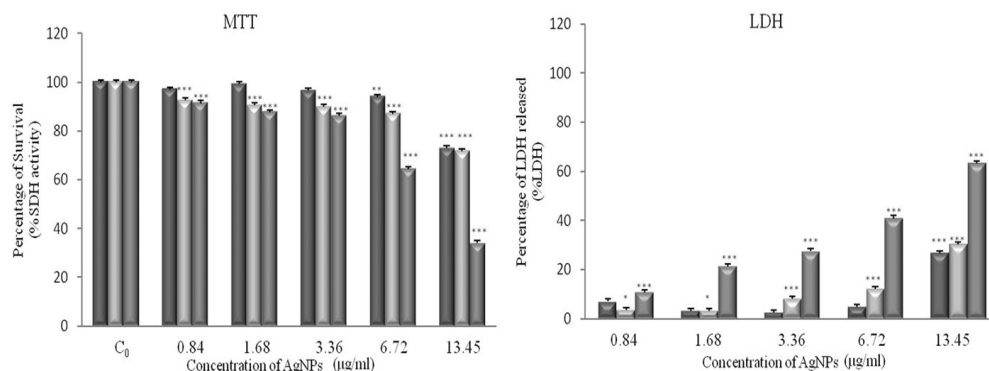


Figure 5. Effects of AgNPs 157 nm on HPF cell viability by MTT and LDH assays. Cells were cultured with different concentrations of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 h (▨). C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \* $p \leq 0.05$ .

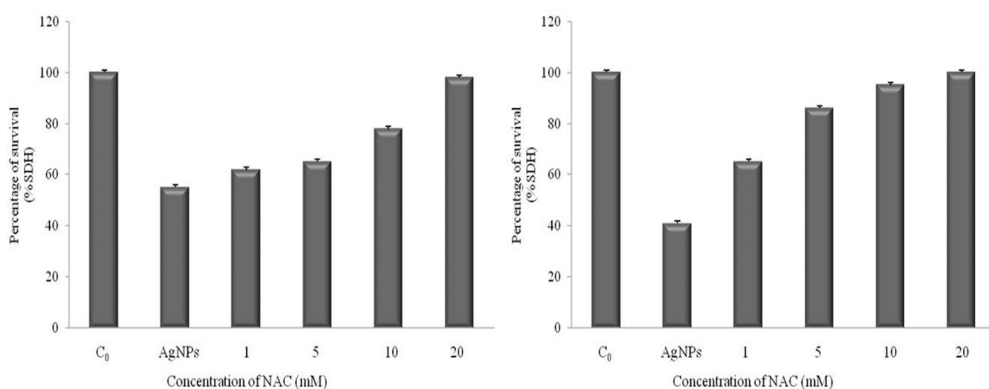


Figure 6. Protective effects of NAC against treatment with 13.45 µg/mL of AgNPs on HepG2 (A) and HL-60 (B) cell viability by MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 h.

#### Protective effect of NAC

NAC can interact directly with ROS and nitrogen species because it is a scavenger of oxygen free radicals (Zafarullah et al., 2003). In tumoral cells AgNP-induced inhibition of MTT reduction was largely prevented by NAC (Figure 6). MTT reduction by HepG2 cells (Figure 6A) pretreated with

20 mM NAC prior to a 24 h treatment with 13.45 µg/ml of AgNPs was almost equivalent to that of untreated controls. On HL-60 cells (Figure 6B), the pretreatment with 10 mM NAC prior to treatment with 13.45 µg/ml of AgNPs was sufficient to obtain 98% cell viability. Similarly, results were obtained with non-tumor cells (Figure 7). Pretreatment with

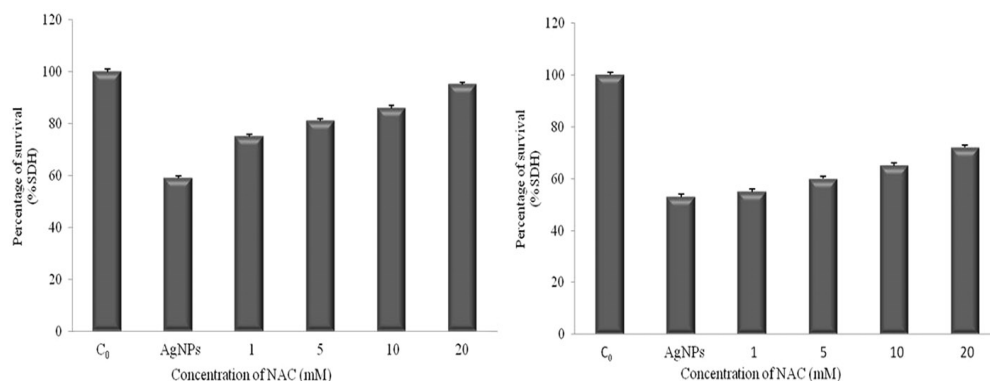


Figure 7. Protective effects of NAC against treatment with 13.45 µg/mL of AgNPs on NHDF (A) and HPF (B) cell viability by MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 h.

20 mM NAC showed the highest protective effect against the treatment with 13.45 µg/mL of AgNPs, on NHDF (Figure 7A, 95% of cell survival) and HPF (Figure 7B, 72% of cell survival) cells. Thus, our results suggest that oxidative stress is in part primarily responsible for the cytotoxicity of AgNPs.

## Discussion

NPs may cause adverse effects because of their small size and unique properties (Sayes et al., 2006). The NPs are believed to be highly mobile in the human body or various environments and appear to penetrate and accumulate in different tissues (Liu et al., 2008). They are thought to strongly interact with various protein and nucleic acid structures and could either enhance or limit various cellular functions (Mahmood et al., 2010). We initially observed the AgNPs morphology and our results showed that all NPs were ovals. In addition, one of the most significant factors for the toxicity of nanomaterials is its size. Usually, the sizes of the primary NPs are determined by microscopic techniques; however, NPs are easily aggregated or agglomerated in a cell culture medium for *in vitro* toxicity assessment because the high ionic nature of the solution and the electrostatic/van der Waals interaction between protein and NPs result in the formation of secondary particles (Horie et al., 2012; Kato, 2011).

In this study, characterization of NPs showed that AgNPs in aqueous solution were approximately 30–123 nm in diameter (TEM). However, the size distributions of particles suspended in supplement cell medium (DLS) showed an average diameter of 192–216 nm. Therefore, not only the size of the primary NPs but the size of the secondary NPs could also be used as a characteristic parameter to determine the *in vitro* toxicity of NPs in a cell culture medium (Kato, 2011).

Our results also demonstrated that human tumoral cells were more sensitive to the cytotoxic effect of AgNPs than human normal cells. On tumoral cells, no cytotoxic effect was found on HepG2, HL-60 cells after treatment with AgNPs (13.45 µg/mL) for 24 h. However, for 48 and 72 h, a significant decrease in cell survival was observed. HepG2 cell line was more sensitive (7%) than HL-60 cells (46% of cell survival), to the cytotoxic effect of AgNPs for 72 h. According to our results, Johnston et al. (2010) reported that the liver appears to

be the primary site of accumulation, which is likely to derive from the uptake of particles by resident liver macrophages, contained within the reticuloendothelial system, which remove particles from the circulation. Thus, this could explain the greater susceptibility of HepG2 cells. Kim et al. (2009) also studied the cytotoxicity of AgNPs on HepG2 cells. HepG2 showed a strong sensitivity to treatment with AgNPs (IC<sub>50</sub> was 3.38 µg/mL by MTT assay, and 0.53 µg/mL by LDH). Other authors have compared the cytotoxicity of AgNPs on different tumor cell lines, as Arora et al. (2008). They evaluated the cytotoxic effect of AgNPs on human fibrosarcoma (HT-1080) and human skin carcinoma (A431) cells. However, their cytotoxicity results did not show difference between both cell lines.

On human normal cells (NHDF, HPF) no cytotoxicity was observed for 24, 48 and 72 h of the treatment with AgNPs (13.45 µg/mL), with the exception of HPF for 72 h where the percentage of cell survival strongly decreased to 34%. On the contrary, Arora et al. (2009) also observed a decrease in the primary mouse fibroblast viability, after 24 h of treatment with AgNPs (IC<sub>50</sub> was 61 µg/mL). In addition to fibroblast, the toxicity of AgNPs has been investigated in various cell types, including BRL3A rat liver cells (Hussain et al., 2005), PC-12 neuroendocrine cells (Hussain et al., 2006), human alveolar epithelial cells (Park et al., 2007) and germline stem cells (Braydich-Stolle et al., 2005). All of them showed a decrease in cell viability after treatment with AgNPs.

In this study four types of human cells HepG2 (hepatoma), HL-60 (blood), NHDF (skin) and HPF (pulmonary) have been used. These cells are most exposed to *in vivo* exposure of AgNPs. *In vitro* investigations often focus on one cell type from the organ or tissue of interest, in order to understand the implications of particle exposure. However, a collection of cells is present within tissues that may not be similarly affected by particle exposure, so that cell-specific effects may manifest. Therefore, it is very important to know how these NPs interact with different types of cells. In addition, it was revealed that there may be cell types that differ with regard to their sensitivity to AgNP exposure (Johnston et al., 2010). Soto et al. (2007) investigated the cytotoxicity of a panel of NPs, including AgNPs to human and murine lung macrophages and epithelial cell lines. Their results showed that



DOI: 10.3109/15376516.2012.762081

murine macrophage cell line was particularly sensitive to the toxicity of AgNPs, implying that cells vary in their sensitive to particle toxicity.

In addition, results obtained by LDH assay were slightly lower than those calculated from the data collected using MTT, which could suggest that cell membrane integrity is more readily affected by AgNPs than the tested metabolic activities. According to our results, Kim et al. (2009) found that the  $IC_{50}$  of AgNPs determined by the LDH assay was lower than that calculated from the data collected using the MTT assay on HepG2 cells.

It has been suggested that the general trend of NP cytotoxicity is similar among various types of NPs (Jin et al., 2008) and that nonspecific oxidative stress is one of the largest concerns in NP-induced toxicity (Colvin, 2003; Nel et al., 2006; Xia et al., 2006). Consistent with those findings, the cytotoxicity induced by AgNPs was efficiently prevented by NAC treatment (Figures 6 and 7). It would appear that the toxicity of AgNPs is mediated by an increase in ROS production, which activates oxidant-sensitive signaling pathways, and stimulates inflammation and genotoxic events, to eventually culminate in cell death (Johnston et al., 2010). It is also relevant that the concentration of AgNPs administered is able to influence the toxicity that is apparent; specifically, at low levels of oxidative stress, a protective response is initiated (Arora et al., 2009), which progresses to a damaging response (Hussain et al., 2005) with increasing particle concentration, and therefore oxidant levels (Nel et al., 2006).

## Conclusion

Our results suggest that AgNPs are cytotoxic on human tumor and normal cells, the tumor cells being more sensitive to the cytotoxic effect of AgNPs. In addition, NAC protects human cells from cytotoxicity of AgNPs, suggesting that oxidative stress is in part responsible for this effect.

## Acknowledgements

We thank to the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain for use the DLS equipment.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This work has been supported by Grant AGL2010-16561 from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). A. Ávalos is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain).

## References

- Albanese A, Sykes EA, Chan WC. (2010). Rough around the edges: the inflammatory response of microglial cells to spiky nanoparticles. *ACS Nano* 4:2490–3.
- Almengor L. (2009). Nanotecnología en la industria alimentaria. *Revista Electr* 13:35–52.
- Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. *Toxicol Lett* 179:93–100.
- Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 236:310–18.
- Barnard AS, Xu HF. (2008). An environmentally sensitive phase map of titania nanocrystals. *ACS Nano* 2:2237–42.
- Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, et al. (2012). Toxicity of silver nanoparticles – nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett* 208:286–92.
- Boucher W, Stern JM, Kotsynyan V, et al. (2008). Intravesical nanocrystalline silver decreases experimental bladder inflammation. *J Urol* 179:1598–602.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. (2005). *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian stem cells. *Toxicol Sci* 88:412–19.
- Cheng D, Yang J, Zhao Y. (2004). Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use. *Chin Med Equip J* 4:26–32.
- Cohen MS, Stern JM, Vanni AJ, et al. (2007). *In vitro* analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surg Infect* 8:397–403.
- Colvin VL. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol* 21:1166–70.
- Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, et al. (2009). PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett* 190:156–62.
- Horie M, Kato H, Fujita K, et al. (2012). *In vitro* evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem Res Toxicol* 25:605–19.
- Hsin YH, Chen CF, Huang S, et al. (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 179:130–9.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, et al. (2005). *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 19:975–83.
- Hussain S, Javorina A, Schrand A, et al. (2006). The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci* 92:456–3.
- Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. (2008). Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol* 21:1871–77.
- Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, et al. (2010). A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* 40:328–46.
- Kato H. (2011). *In vitro* assays: tracking nanoparticles inside cells. *Nat Nanotechnol* 6:139–40.
- Kim S, Choi JE, Choi J, et al. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 23:1076–84.
- Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci Total Environ* 407:5243–6.
- Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, et al. (2009). Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations – many questions, some answer. *Mutat Res* 681:241–58.
- Liu Z, Davis C, Cai W, et al. (2008). Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci* 105:1410–15.
- Mahmood M, Casciano DA, Mocan T, et al. (2010). Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. *J Appl Toxicol* 30:74–83.
- Maurer-Jones MA, Lin YS, Haynes CL. (2010). Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano* 4:3363–73.
- Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, et al. (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444:267–9.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311:622–7.
- Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, et al. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol* 2:8 (1–35).
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823–39.
- Park S, Lee YK, Jung M, et al. (2007). Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal Toxicol* 19:59–65.
- Piao MJ, Kang KA, Lee IK, et al. (2011). Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of

Silver nanoparticles impact on human cells 159

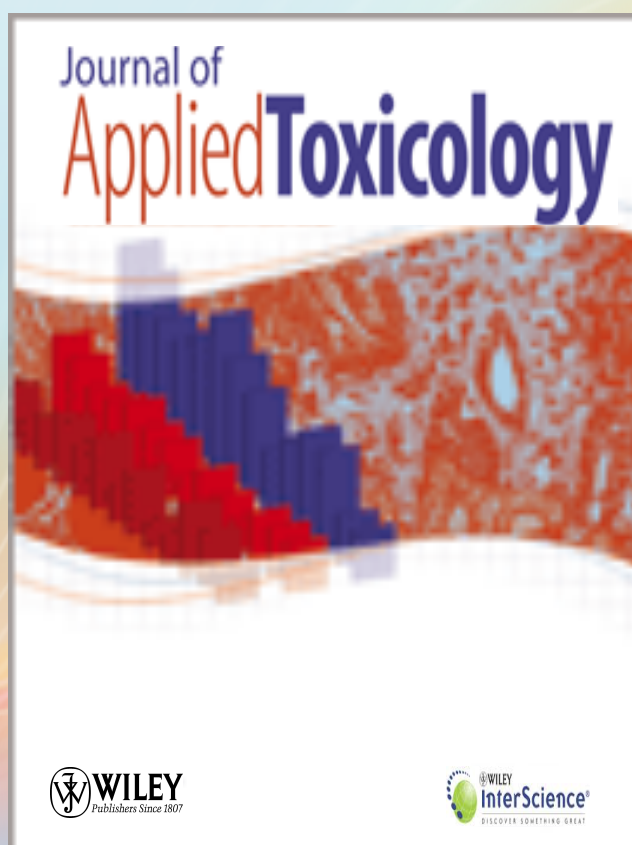
- reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett* 201:92–100.
- Porter AE, Gass M, Bendall JS, et al. (2009). Uptake of noncytotoxic acid-treated single-walled carbon nanotubes into the cytoplasm of human macrophage cells. *ACS Nano* 3:1485–92.
- Pray L, Yaktine A. (2009). Nanotechnology in food products: workshop Summary. Food Forum. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine of the National Academies. Washington, DC: The National Academies Press.
- Rosas-Hernández H, Jiménez-Badillo S, Martínez-Cuevas PP, et al. (2009). Effect of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett* 191:305–13.
- Sayes MC, Wahi R, Kurian PA, et al. (2006). Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 92:174–85.
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). (2006). Opinion consultation on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Brussels: European Commission Health and Consumers Directorate-General.
- SCENIHR. (2009). Risks assessment of products of nanotechnologies. Brussels: European Commission Health and Consumers Directorate-General.
- Soto K, Garza KM, Murr LE. (2007). Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater* 3:351–8.
- Stickler DJ. (2000). Biomaterials to prevent nosocomial infections: is silver the gold standard? *Curr Opin Infect Dis* 13:389–93.
- The Government of the Hong Kong Special Administrative Region. Center for food safety (2010). Nanotechnology and food safety. Risk assessment studies. Report 41. The project on Emerging Nanotechnologies. Available from: <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/updates/> [last accessed 3 Oct 2011].
- Xia T, Kovichich M, Brant J, et al. (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 6:1794–807.
- Xu B, Zheng Q, Song Y, Shangguan Y. (2006). Calculating barrier properties of polymer/clay nanocomposites: effect of clay layers. *Polymer* 47:2904–10.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60: 6–20.

## Artículo II

---

### **Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells**

**Journal of Applied Toxicology (2014), 34: 413-423**







## Research Article

Journal of  
Applied Toxicology

Received: 12 July 2013,

Revised: 10 September 2013,

Accepted: 28 September 2013

Published online in Wiley Online Library: 15 November 2013

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jat.2957

# Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells

Alicia Avalos<sup>a</sup>, Ana Isabel Haza<sup>a</sup>, Diego Mateo<sup>a</sup> and Paloma Morales<sup>a\*</sup>

**ABSTRACT:** Silver nanoparticles (AgNPs), which have well-known antimicrobial properties, are extensively used in various medical and general applications. In spite of the widespread use of AgNPs, relatively few studies have been undertaken to determine the cytotoxic effects of AgNPs. The aim of this study was investigate how AgNPs of different sizes (4.7 and 42 nm) interact with two different tumoral human cell lines (hepatoma [HepG2] and leukemia [HL-60]). In addition, glutathione depletion, inhibition of superoxide dismutase (SOD) and reactive oxygen species (ROS) generation were used to evaluate feasible mechanisms by which AgNPs exerted its toxicity. AgNPs of 4.7 nm and 42 nm exhibited a dramatic difference in cytotoxicity. Small AgNPs were much more cytotoxic than large AgNPs. A difference in the cellular response to AgNPs was found. HepG2 cells showed a higher sensitivity to the AgNPs than HL-60. However, the cytotoxicity induced by AgNPs was efficiently prevented by NAC treatment, which suggests that oxidative stress is primarily responsible for the cytotoxicity of AgNPs. Furthermore, cellular antioxidant status was disturbed: AgNPs exposure caused ROS production, glutathione depletion and slight, but not statistically significant inactivation of SOD. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** silver nanoparticles; cytotoxicity; N-acetyl-cysteine; reactive oxygen species; glutathione; superoxide dismutase

## Introduction

Research during the last decades in science and engineering has resulted in the fabrication of atomically precise structures and devices in the nanometer scales – this is commonly known as nanotechnology (Savage *et al.*, 2007). ‘Nanomaterial’ means a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 to 100 nm (Comission recommendation, 2011).

The materials at a ‘nano’ scale show new and different properties compared with what they exhibit on a macroscale, enabling unique applications (Jos *et al.*, 2009). This makes nanomaterials attractive for exploitation within diverse products and, therefore, the field of nanotechnology is expanding at a rapid rate, as a result of the benefits promised by the incorporation of nanomaterials into products (Johnston *et al.*, 2010). With the development of nanotechnology, the size effects of particles have gradually been considered to be important (Kim *et al.*, 2011). Therefore, an improved understanding of the potential risks, comprising of exposure and hazard assessments, associated with exposure to nanomaterials is necessary (Maynard *et al.*, 2006) to check its toxicity or safety.

Even although nanomaterials are currently being widely used in modern technology, there is a serious lack of information concerning the human health and environmental implications of manufactured nanomaterials (Hussain *et al.*, 2005). The main feature of these nanomaterials is that in comparison with bulk materials, nanoparticles (NPs) possess a higher surface-to-volume ratio and thus an enhanced contact area with their surroundings than do bulk materials at the same mass (Maurer-Jones *et al.*, 2010). This could mean that catalytic or

other active sites on the particle surface are exposed, in some cases inducing the formation of reactive oxygen species (ROS) (Barnard and Xu, 2008). As a result of their small size, NPs are retained in many cells and organs to a larger extent than are larger particles (Porter *et al.*, 2009). Some NPs readily travel throughout the body, deposit in target organs, penetrate cell membranes, lodge in mitochondria and may trigger injurious responses (Nel *et al.*, 2006). Also, in comparison with unstructured bulk material, the shape of NPs can play a crucial role in a determining response (Albanese *et al.*, 2010).

Silver (Ag) is well known for its antimicrobial activity (Stickler, 2000). The antimicrobial properties of silver nanoparticles are being increasingly exploited in consumer products such as deodorants, clothing materials, bandages and also in cleaning solutions and sprays (Chen and Schluesener, 2008; Tripathy *et al.*, 2008). It is estimated that of all the nanomaterials used in consumer products, AgNPs currently have the highest degree of commercialization (Henig, 2007). In spite of the increasing use of AgNPs in commercial products, little is known about the toxicity and cellular responses to AgNPs, and therefore the potential impacts of AgNPs on humans and environmental health.

Some previous research suggests that the toxicity of AgNPs arises in part from their effect on cellular energy metabolism, as AgNPs decrease mitochondrial function. AgNP cytotoxicity has also been shown to be associated with oxidative stress

\*Correspondence to: Paloma Morales, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.  
Email: pmorales@vet.ucm.es

<sup>a</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

(Arora et al., 2008; Carlson et al., 2008; Hussain et al., 2005). AgNPs were reported to act via ROS generation and glutathione depletion (Hussain et al., 2005). The depletion of antioxidants including glutathione and protein bound sulfhydryl groups and the increase in activity of various anti-oxidant enzymes indicative of lipid peroxidation have been implicated in oxidative damage of cell molecules (Ahamed and Siddiqui, 2007).

The exposure to AgNPs could occur through the air, skin, food and the use of medical devices (Oberdorster et al., 2005). Thus, it is important to investigate the toxicity of AgNPs in relevant human tissues. In our study, human hepatoma cells (HepG2) were used because the liver is a primary site of AgNPs accumulation after exposure (Johnston et al., 2010). AgNPs have recently been studied in terms of drug delivery which would involve intravenous application (Boucher et al., 2008). Thus, it is crucial to investigate the effect of AgNPs on blood cells and in the present study a tumoral human leukemia cell line (HL-60) was used.

The main goal of the present work was to study how AgNPs of different sizes (4.7 and 42 nm) interact with two different tumoral human cell lines (hepatoma and leukemia) in order to understand the impact of such nanomaterials on cellular biological functions. In addition, the total glutathione content, activity of superoxide dismutase (SOD) and ROS generation were used to evaluate feasible mechanisms by which AgNPs exerted their toxicity.

## Material and Methods

### Chemicals

All chemicals were reagent grade or higher and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise specified. Water-based solutions of AgNPs of 4.7 and 42 nm in diameter were purchased from Nanogap Subparticles (A Coruña, Spain). A summary of the characterization according to the manufacturer's data is available in Table 1. Stock solutions of AgNPs were diluted to the required concentrations using the respective cell culture medium. N-Acetyl-L-cysteine (NAC) was purchased from Sigma-Aldrich, Inc.

### Nanoparticles Characterization

To verify the size indicated by the provider, transmission electron microscopy (TEM) characterization was performed to determine the primary sizes of nanoparticles and their morphology. AgNPs solutions were sonicated (Branson 2510 water bath; 40 KHz) for 30 min in order to reduce agglomeration (clusters of particles held together by weak forces) and then a drop of aqueous AgNPs solution (3 µl) was placed onto a carbon-coated copper grid, air dried and observed with TEM (JEOL, JEM 2100;

Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) from Centro de Microscopía Electrónica, Complutense University, Madrid, Spain. In addition, AgNPs were also observed after incubation in cell-free culture media (0.2% v/v) for 24 h at 37 °C. Image J software was used to measure the size of the AgNPs. The mean and standard deviation (SD) of particle sizes was calculated from measuring over 100 nanoparticles in random fields of view in addition to the images showing the general morphology of the nanoparticles, as previously described (Murdock et al., 2008).

Dynamic light scattering (DLS) was used for characterization of the hydrodynamic size of AgNPs after incubation in different cell-free culture media for 24 h, performed on a Malvern Instruments Zetasizer Nano-ZS from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain, as described previously by Murdock et al. (2008). The method yields a hydrodynamic diameter, which is a calculated particle diameter of a sphere that has the same measured motion in the solute as the actual particle.

### Cell Culture

Tumoral human leukemia cells (HL-60) and human hepatoma cells (HepG2) were obtained from the Biology Investigation Centre Collection (BIC, Madrid, Spain). HL-60 cells were maintained in RPMI 1640 Medium and HepG2 cells were cultured as monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). The media were supplemented with 10% v/v heat-inactivated fetal calf serum, 50 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin, 50 UI ml<sup>-1</sup> penicillin and 1% v/v L-glutamine. Culture medium and supplements required for the growth of the human tumoral cell lines were purchased from Gibco (Laboratories Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). All human cell cultures were incubated at 37 °C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Cytotoxicity Endpoints

A MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction and lactate dehydrogenase (LDH) leakage were used as parameters for cytotoxicity assessment. The MTT assay was assessed according to the manufacturer's instructions (Cell Proliferation Kit I; Roche, Indianapolis, IN, USA). Briefly, HepG2 cells (1 × 10<sup>6</sup> cells per ml) were plated onto multiwell systems and incubated for 24 h. After seeding, 100 µl of different concentrations of AgNPs (0.84–500 µg ml<sup>-1</sup>) or negative (without AgNPs) and positive controls (20 mM of N-nitrosodibutylamine, NDPA, 5% cell viability; García et al., 2008) were added to the wells and the plates were incubated for 24, 48 and 72 h at 37 °C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Previously, in order to reduce agglomeration, the AgNPs suspensions were mixed using a vortex for 20 s and sonicated for 30 min. The optical

**Table 1.** Characteristics of silver nanoparticles (AgNPs) obtained from NanoGap.

| Code   | Particles | Avg <sup>a</sup> ± SD (nm) | Dispersion solution               | Density (g ml <sup>-1</sup> ) | Density of particle (part per l) | Color                        | pH  |
|--------|-----------|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|-----|
| 2106-W | AgNP 4.7  | 4.7 ± 1                    | Aqueous solution with PEI and PVP | 1.024                         | 1.75 × 10 <sup>19</sup>          | Black, yellow (when diluted) | 9.3 |
| 2103-W | AgNP 42   | 42 ± 9                     | Aqueous solution                  | 1.01                          | ND                               | Brown                        | ND  |

ND, no information provided. PEI, polyetherimide. PVP, polyvinylpyrrolidone

<sup>a</sup>As provided by the company.

density (OD) of each well was read at 620 nm (test wavelength) and 690 nm (reference wavelength) by an ELISA with a built-in software package for data analysis (iEMS Reader MF; Labsystems, Helsinki, Finland). In experiments with HL-60 cells, the plates were incubated with  $1 \times 10^6$  cells per ml in complete culture medium and 50  $\mu$ l of each of the different concentrations of AgNPs was added to each well (0.84–500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). The plates were then incubated for different times (24, 48 and 72 h) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and then processed as described above.

The percentage of cell survival (% SDH) is defined as the ratio of the number of cells in the presence of AgNPs to the number in the absence of AgNPs; it is defined by the following relationship: % SDH activity =  $(A_1/A_0) \times 100$ , where  $A_1$  is the absorbance of the cells exposed to the AgNPs, and  $A_0$  is the absorbance of the negative control. All the concentrations were tested in 12 replicates and values presented in this paper are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

Membrane integrity was assessed by measuring extracellular lactate dehydrogenase (LDH) according to the procedures described in the manufacturer's instructions [Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche]. Briefly, HepG2 cells were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells per ml culture medium. Twenty-four hours after seeding, 100  $\mu$ l of different concentrations of AgNPs (0.84–500  $\mu$ g/ml) or negative and positive controls was added to the wells and the plates were incubated for 24, 48 and 72 h at 37 °C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In order to reduce agglomeration previously, the AgNPs suspensions were mixed using a vortex for 20 s and sonicated for 3 min. Cell-free culture media was collected from each well and incubated with a reaction mixture for 30 min. The plates were read with a microplate reader (iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finland) at 490 nm. A solution of 2% Triton X-100, which lead to 100% cytotoxicity through cell lysing and thus to maximum LDH leakage, was used as a positive control. In the assays with the HL60 cell line, the plates were incubated with  $5 \times 10^5$  cells per ml in culture medium and 100  $\mu$ l of different concentrations of AgNPs was added to each well (0.84 to 500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). The plates were then incubated for different times 24, 48 and 72 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and then processed as described above.

The release of LDH leakage was calculated as follows: LDH leakage (%) =  $(\text{experimental value} - \text{untreated control}) / (\text{positive control} - \text{untreated control}) \times 100$ . All the concentrations were tested in 12 replicates and values presented in this paper are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

#### Protective Effect of N-Acetyl-L-cysteine (NAC) Against AgNPs-induced Cytotoxicity

NAC is an important antioxidant and serves as a precursor for the synthesis of glutathione (Nel *et al.*, 2006). The protective effect of NAC against AgNPs-induced cytotoxicity was evaluated using the MTT assay. Briefly, HepG2 and HL-60 cells were pretreated for 2 h with NAC at different concentrations (1, 5, 10 and 20 mM) prior to a 24-h treatment with the 24-h MTT EC<sub>50</sub> (concentration of AgNPs yielding 50% growth inhibition) of the corresponding AgNPs. Then, the procedure is equal to the MTT assay described above.

#### Intracellular ROS Measurement

ROS production was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) from Molecules Probes (Eugene, OR, USA).

H<sub>2</sub>DCFDA diffuses through the cell membrane and is hydrolyzed by esterases to non-fluorescent dichlorofluorescein (DCFH). In the presence of ROS, this compound is oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF). For these experiments, HepG2 and HL-60 cells were cultured in RPMI 1640 Medium and DMEM, respectively, without phenol red and without fetal calf serum. After the seeding of HepG2 and HL-60 cells, 1 ml of AgNPs of 4.7 (1.62 and 3.36  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, respectively) and 42 nm (13.45  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) or a positive control (20 mM NDBA, 90% ROS production; García *et al.*, 2008) were added to the wells and the plates were incubated for 48, 24, 3 h, and 30 and 15 min. Previously, we performed the assay with different concentrations of AgNPs of 4.7 and 42 nm to select the highest ROS production. However, with AgNPs a significant ROS production could only be measured at the lower concentrations. Then,  $2 \times 10^5$  cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) loaded for 30 min with H<sub>2</sub>DCFDA (10  $\mu$ M) and incubated in a water bath (37 °C). The cells were kept on ice and the fluorescence intensity was read immediately with a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson) (New Jersey, USA) and CellQuest software (Centro de Microscopia y Citometría, UCM). For each experiment, 10<sup>4</sup> cells were analyzed.

#### Total Glutathione Content

The total glutathione content was measured using a commercial colorimetric assay kit, OxiSelect Total Glutathione (GSSG/GSH) (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA). The assay was assessed according to the manufacturer's instructions. Briefly, HepG2 and HL60 cells were treated with 24-h MTT EC<sub>50</sub> of the corresponding AgNPs for 24, 48 and 72 h. After treatment, cells were centrifuged and washed with cold 1 $\times$  PBS. The pellet was resuspended with 200–500  $\mu$ l ice-cold 0.5% MPA, the cells were again centrifuged at 137 g for 5 min at 4 °C and the supernatant was collected. Then, 25  $\mu$ l 1 $\times$  glutathione reductase and 25  $\mu$ l 1 $\times$  NADPH were added to 96-well plate and after that 100  $\mu$ l of the samples was added. Finally, 50  $\mu$ l 1 $\times$  chromogen was added and mixed briefly. Immediately, the absorbance was recorded at 405 nm at 2-min intervals for 10 min.

The total glutathione content was determined by comparison with the predetermined glutathione standard curve. The results are expressed as a percentage of the total glutathione (GSSG/GSH) content.

#### Superoxide Dismutase Activity

The SOD activity was measured using a commercial colorimetric assay kit, OxiSelect Superoxide Dismutase Activity (Cell Biolabs, Inc.). Briefly, HepG2 and HL60 cells were treated with 24-h MTT EC<sub>50</sub> of the corresponding AgNPs for 24, 48 and 72 h. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS and were then incubated on ice with 1 $\times$  Lysis Buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton-100) for 10 min. Later, the cells were centrifuged at 12 000 g for 10 min and the cell lysate supernatant was collected and added (10  $\mu$ l) to a 96-well plate and then the master mixture was added. Finally, 10  $\mu$ l 1 $\times$  Xanthine Oxidase Solution was added and immediately the absorbance was read at 490 nm.

The results are expressed as a percentage of SOD activity and calculated as follows: SOD activity =  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ , where  $A_0$  is the absorbance of the negative control, and  $A_1$  is the absorbance of the cells exposed to the AgNPs.

### Statistical Analyses

All means were calculated from three independent experiments, and are expressed in the graphs as the mean and SD. Student's t-test was used for statistical comparison and differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ . Descriptive and graphical methods were used to characterize the data. All tests were performed with the software package Statgraphics Plus 5.0.

## Results

### Nanoparticles Characterization

The particle size and shape of the AgNPs of 4.7 and 42 nm as imaged by TEM, in addition to the size distribution in aqueous solution by TEM and in free culture media by DLS are presented in Figs 1 and 2. As can be seen, the majority of the AgNPs (both size) were approximately spherical, multi-faceted or slightly elongated shape and well dispersed. However, after incubation on cell-free culture media, AgNPs of 42 nm formed agglomerates (Fig. 2B). The primary size of AgNPs (Fig. 1C and 2C) was found to be  $5.5 \pm 2.8$  nm (SE) in AgNPs of 4.7 nm, and  $41.06 \text{ nm} \pm 9.3$  nm (SE) in AgNPs of 42 nm by TEM, the statistical results are listed in Table 2. The reported size of the NPs is defined as the maximum distance between two points on the particle circumference equivalent to the diameter for spherical particles. After incubation of AgNPs in cell-free culture media, the DLS size analysis (Fig. 1D and 2D) revealed that AgNPs of 4.7 nm showed agglomeration in HepG2 and HL-60 media, with a major peak size at 106.2 nm (~80% intensity) and 101 nm (~90% intensity) and minor peak at 10.6 nm (~10% intensity) and 9.1 nm (~10% intensity), respectively. AgNPs of 42 nm also showed agglomeration in HepG2 and HL-60 media, with a peak size at 126.5 nm (~98% intensity) and 102.3 nm (~100%), respectively.

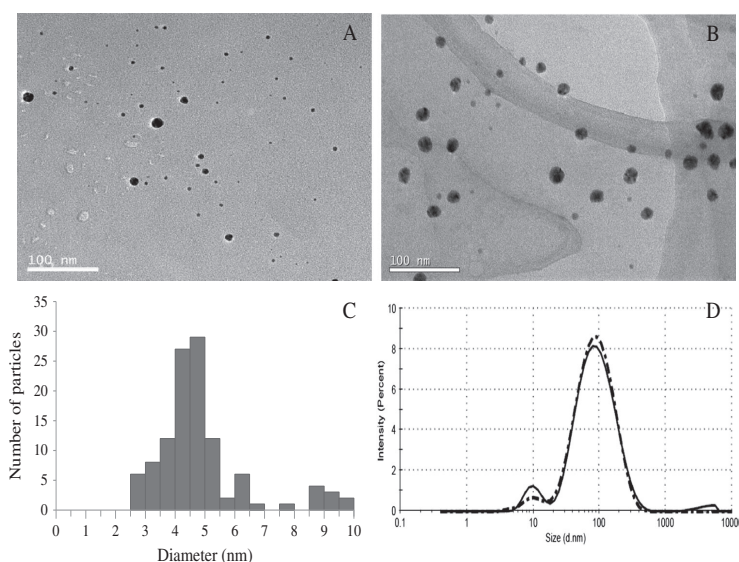
A summary of AgNPs size characteristics by TEM and DLS are shown in Table 2.

### Effect of AgNPs on Cellular Viability

Two cytotoxicity markers, MTT and LDH leakage, were used to evaluate the effects of AgNPs on cellular viability. The results of the MTT viability assay showed a significant decrease in mitochondrial function of HepG2 cells exposed to AgNPs of 4.7 nm at the concentrations of 3.36, 6.72 and  $13.45 \mu\text{g mL}^{-1}$  and all incubation times (14%, 5% and 4% of cell survival, respectively) (Fig. 3A). HepG2 cell treatment with AgNPs of 4.7 nm resulted in a dose-dependent increase of LDH leakage into culture media, signifying an AgNP-induced compromise of plasma membrane integrity. Similarly to the MTT results, AgNPs at the concentrations of 3.36, 6.72 and  $13.45 \mu\text{g mL}^{-1}$  increased dramatically the percentage of LDH leakage (80%, 98% and 99%, respectively).

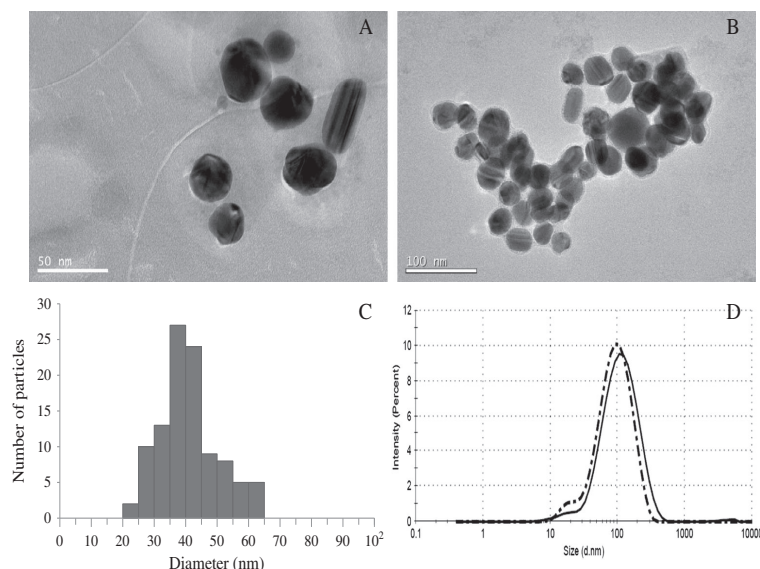
Figure 3B shows the cytotoxic effect of AgNPs of 42 nm on HepG2 cells. Data obtained with the MTT assay showed a slight inhibition of the HepG2 cell viability for all times of treatment with 6.72, 13.45 and  $26.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  AgNPs (90%, 84% and 80% of cell survival, respectively). However, the concentrations of 100 and  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  showed a large decrease in cell viability at all incubation times (33% and 17% of survival, respectively). Outcomes achieved with LDH show that the percentage of LDH released was lower than 39% at concentrations of 6.72– $26.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  for all of the treatment times. Whereas the release of LDH increased to 65% and 95% at concentrations of 100 and  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , after 48 and 72 h of incubation.

The effect of AgNPs on HL-60 cell viability by MTT and LDH assays is shown in Figure 4. The MTT assay revealed that AgNPs of 4.7 nm induced a significant dose and time-dependent inhibition on cell growth in the HL-60 cell line. As can be seen in Fig. 4A, HL-60 cell viability presented a moderate inhibition after



**Figure 1.** Representative transmission electron microscopy (TEM) images of silver nanoparticles (AgNPs). AgNP 4.7 nm (A) was well dispersed in aqueous solution. (B) Image of AgNP after 24-h incubation in cell-free culture media. Scale bars represent 100 nm. Distribution of size of AgNPs in aqueous solution by TEM (C). DLS size distributions (D) for 24-h incubations of AgNPs in HepG2 media (—) and HL-60 media (---).





**Figure 2.** Representative transmission electron microscopy (TEM) images of silver nanoparticles (AgNPs). AgNP 42 nm (A) was well dispersed in aqueous solution. (B) Image of AgNP after 24-h incubation in cell-free culture media. Scale bars represent 100 nm in A and B. Distribution of the size of AgNPs in aqueous solution by TEM (C). DLS size distributions (D) for 24-h incubations of AgNPs in HepG2 media (—) and HL-60 media (---).

**Table 2.** Summary of silver nanoparticles (AgNPs) size characteristics by transmission electron microscopy (TEM) and DLS

| Particles | TEM                | DLS                                 |                 |
|-----------|--------------------|-------------------------------------|-----------------|
|           | Aqueous solution   | DMEM media                          | RPMI 1640 media |
|           | Size $\pm$ SD (nm) | Hydrodynamic diameter $\pm$ SD (nm) |                 |
| AgNP 4.7  | 5.5 $\pm$ 2.77     | 106.2 $\pm$ 6.5                     | 101 $\pm$ 2.4   |
| AgNP 42   | 41.06 $\pm$ 9.29   | 126.5 $\pm$ 6                       | 102.3 $\pm$ 9.4 |

treatment with 0.84, 1.68 and 3.36  $\mu\text{g ml}^{-1}$  AgNPs for 72 h (67%, 66% and 63% of survival, respectively). However, a strong inhibition of HL-60 cell viability was found after the treatment with 6.72  $\mu\text{g ml}^{-1}$  AgNPs for 72 h (28% of cell survival) and 13.45  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for all incubation times (3% of cell viability). Similarly results were obtained by the LDH assay. The percentage of LDH released increased to 73% at a concentration of 6.72  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for 72 h and 98% at a concentration of 13.45  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and all incubation times.

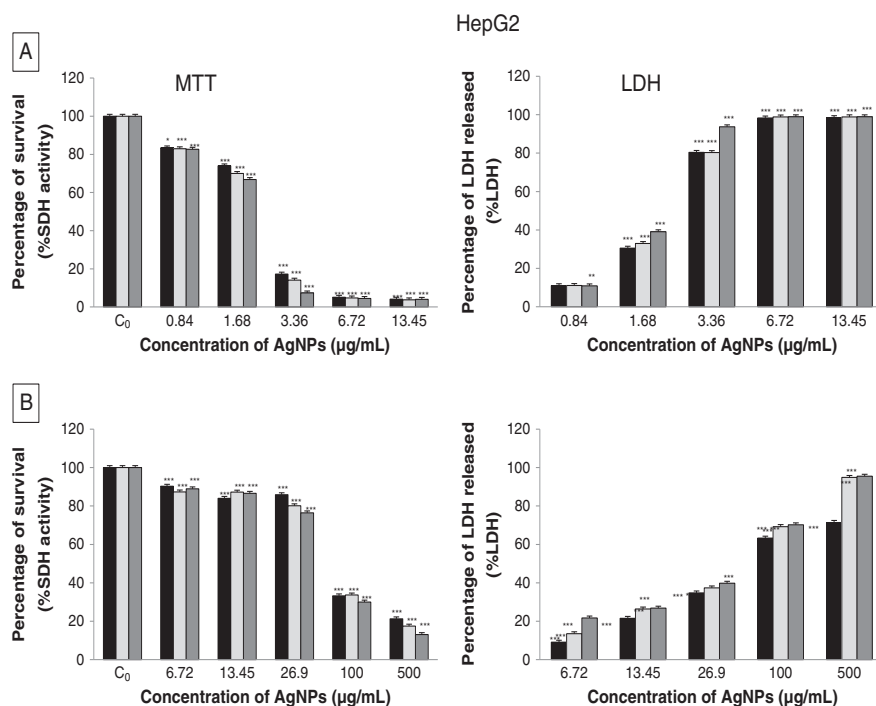
The results of the MTT assay with AgNPs of 42 nm showed a HL-60 cell viability higher than 60% at concentrations of 6.72–100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for all of the treatment times. However, with a concentration of 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  after 24, 48 and 72 h of treatment the cell survival decreased to 43%, 39% and 36%, respectively (Fig. 4B). In the LDH assay, the percentage of LDH leakage was lower than 50% at the concentrations from 6.72 to 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and all incubation times, with the exception of a concentration of 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  AgNPs after 72 h of treatment, where LDH release increased to 54%. Nevertheless

the concentration of 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  showed the highest percentage of LDH released after 24, 48 and 72 h of treatment (60%, 73% and 84% of LDH released, respectively).

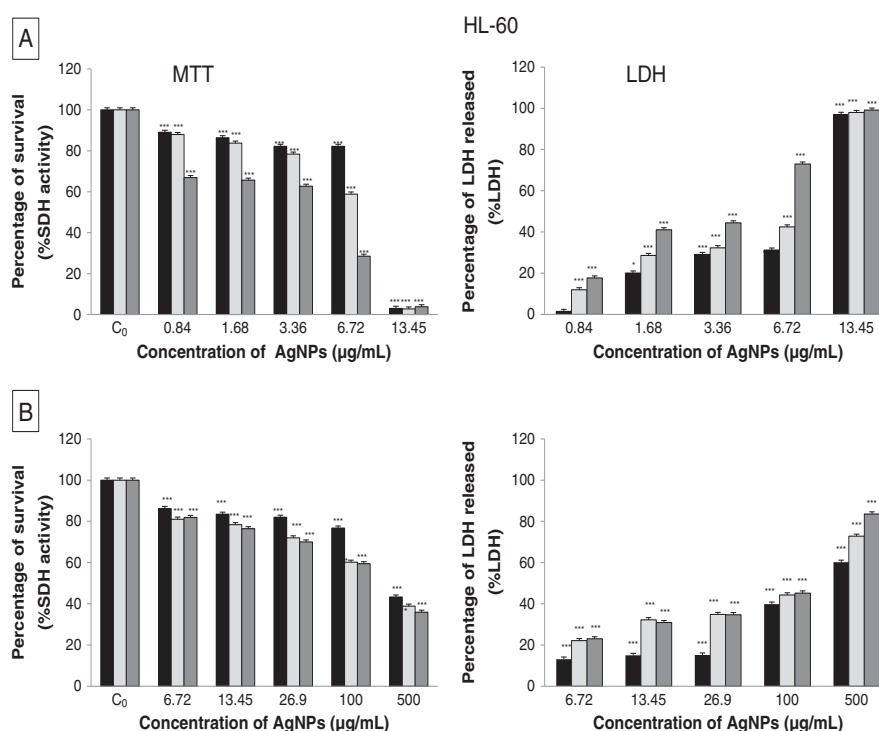
The calculated  $\text{EC}_{50}$  values of the AgNPs of 4.7 and 42 nm in HepG2 and HL-60 cells determined by the MTT and LDH assays are shown in Table 3. The  $\text{EC}_{50}$  of AgNPs of 4.7 nm in HepG2 cells determined by the MTT and LDH assays was approximately  $2.3 \pm 0.59 \mu\text{g ml}^{-1}$  at all incubation times. In HL-60 cells, the  $\text{EC}_{50}$  of AgNPs of 4.7 nm determined by the MTT assay at all incubation times ( $9.46 \pm 1.09$ ,  $7.78 \pm 1.02$  and  $4.61 \pm 0.82 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was not significantly different from AgNPs of 4.7 nm with respect to the induction of the LDH assay ( $8.64 \pm 0.94$ ,  $7.67 \pm 0.81$  and  $4.02 \pm 0.56 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). However, the  $\text{EC}_{50}$  of AgNPs of 42 nm in HepG2 and HL-60 cells determined by the LDH assay was lower than those calculated from the data obtained by the MTT (Table 3), which suggests that cell membrane integrity is more readily affected by AgNPs of 42 nm than the tested metabolic activities.

#### Protective Effect of N-Acetyl-L-cysteine (NAC)

NAC can interact directly with ROS and nitrogen species because it is a scavenger of oxygen-free radicals (Zafarullah *et al.*, 2003). In both cells lines, AgNP-induced inhibition of MTT reduction was largely prevented by NAC (Fig. 5). The viability of HepG2 cells pretreated with 20 mM NAC prior to a 24-h treatment with 24 h MTT  $\text{EC}_{50}$  of AgNPs of 4.7 and 42 nm increased to 80%. On HL-60 cells, pretreatment with NAC at all concentrations (1, 5, 10 and 20 mM) prior to treatment with 24-h MTT  $\text{EC}_{50}$  of AgNPs of 4.7 and of 42 nm increased the percentage of cell viability about 90% and 65%, respectively. Thus, our results suggest that oxidative stress is primarily responsible for the cytotoxicity of AgNPs.



**Figure 3.** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 (A) and 42 nm (B) on HepG2 cell viability by the MTT and LDH assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▨) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate a significant difference from the control \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$  and \* $P \leq 0.05$ .



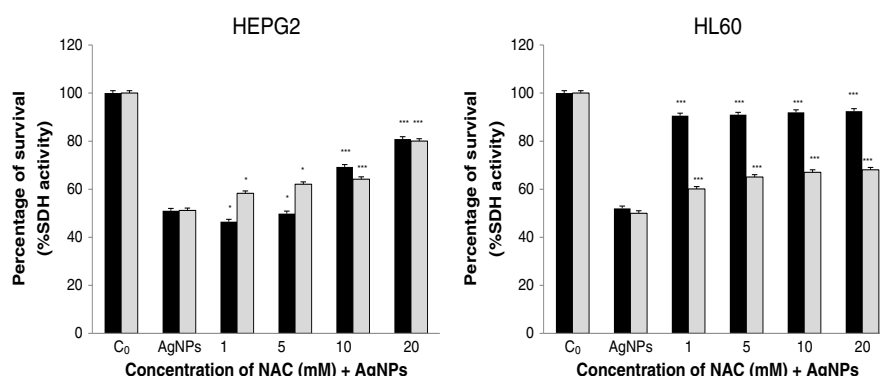
**Figure 4.** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) 4.7 (A) and 42 nm (B) on HL60 cell viability by the MTT and LDH assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▨) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate a significant difference from the control \*\*\* $P \leq 0.001$  and \* $P \leq 0.05$ .

**Table 3.** Calculated EC<sub>50</sub> values in HepG2 and HL-60 cell lines.

| Cell lines | AgNPs 4.7 nm                                      |      |      |   |      |      | AgNPs 42 nm                                       |      |      |   |      |      |
|------------|---|------|------|---|------|------|---|------|------|---|------|------|
|            | MTT assay EC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> ) |      |      | LDH assay EC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> ) |      |      | MTT assay EC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> ) |      |      | LDH assay EC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> ) |      |      |
|            | 24 h  | 48 h | 72 h | 24 h  | 48 h | 72 h | 24 h  | 48 h | 72 h | 24 h  | 48 h | 72 h |
| HepG2      | 2.3   | 2.3  | 2.3  | 2.2   | 2.2  | 2.2  | 83.1  | 76.5 | 76.5 | 65.8  | 55.8 | 51.3 |
| HL-60      | 9.46  | 7.78 | 4.61 | 8.64  | 7.67 | 4.02 | 420   | 291  | 260  | 300   | 180  | 150  |

AgNPs, silver nanoparticles.

The EC<sub>50</sub> values represent the effective concentration of AgNPs that decreases the amount of viable cells to 50% of the maximum after 24, 48 and 72 h as determined by MTT and LDH assays.



**Figure 5.** Protective effects of N-Acetyl-L-cysteine (NAC) against treatment with 24-h MTT EC<sub>50</sub> doses of AgNPs of 4.7 nm (■) and 42 nm (□) in HepG2 and HL-60 cell viability using MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 h. Asterisks indicate a significant difference from the control \*\*\* $P \leq 0.001$  and \* $P \leq 0.05$ .

#### AgNP-derived Induction of ROS

Oxidative stress has been cited as one of the more important mechanisms of toxicity related to NPs exposure (Nel *et al.*, 2006). To investigate the potential role of oxidative stress induced by AgNPs, ROS generation was measured. After treatment of HepG2 and HL-60 cells with AgNPs of 4.7 and 42 nm, DCF fluorescence was measured by flow cytometry and expressed as a percentage of the control. A significant increase of ROS levels was observed in HepG2 cells after treatment with AgNPs of 4.7 (1.62 μg ml<sup>-1</sup>) and 42 nm (13.45 μg ml<sup>-1</sup>), reaching the maximum signal after 15 min and 24 h treatment, respectively. ROS levels increased 2.03-fold (AgNPs of 4.7 nm) and 1.55-fold (AgNPs of 42 nm) more than the control (Fig. 6A). In HL-60 cells, DCF-fluorescence intensity was significantly increased by AgNPs 4.7 of nm (3.36 μg ml<sup>-1</sup>) and 42 nm (13.45 μg ml<sup>-1</sup>) after 24-h exposure, and ROS generation in cells treated was 1.64- and 1.21-fold greater than that in the control, respectively (Fig. 6B).

#### Cellular Antioxidant Response

The action of intracellular molecular antioxidants (glutathione) and regulation of antioxidant enzymes activity, such as superoxide dismutase, are shown in Figs 7 and 8. Our data demonstrated a significant depletion ( $P < 0.05$ ) of the total glutathione content (GSSG/GSH) occurred in AgNPs (4.7 and 42 nm)-exposed cells. The total glutathione content (GSSG/GSH) in HepG2 cells exposed to 24-h MTT EC<sub>50</sub> of AgNPs (4.7 and 42 nm) for 24, 48 and 72 h decreased in a time-dependent manner (Fig. 7A). After 72 h of treatment, both AgNPs depleted GSSG + GSH to 16% and 10%

relative to controls, respectively. In HL-60 cells (Fig. 7B), AgNPs of 4.7 nm (48 and 72 h) completely decreased GSSG + GSH. AgNPs of 42 nm (72 h) reduced 97% of the GSSG + GSH relative to the control.

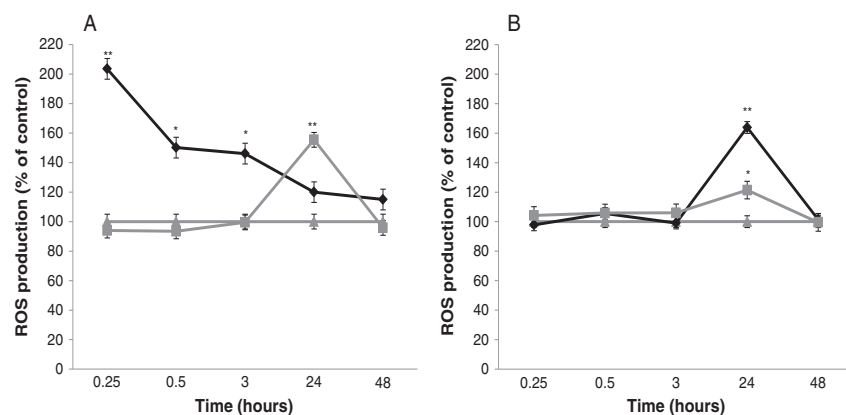
The activity of antioxidant enzymes was also modulated (Fig. 8). Superoxide dismutase activity was slightly reduced after HepG2 and HL-60 treatment with the 24-h MTT EC<sub>50</sub> of AgNPs for 24, 48 and 72 h (approximately 25% and 20%, respectively), but this reduction was not statistically significant.

#### Discussion

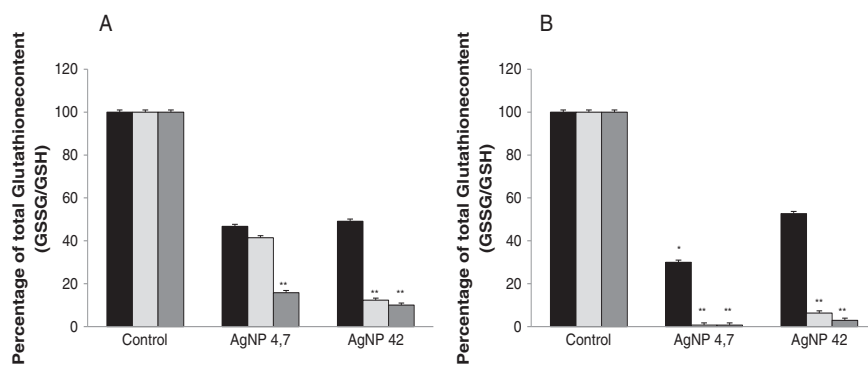
NPs may cause adverse effects because of their small size and unique properties (Sayes *et al.*, 2006). NPs are also believed to be highly mobile in the human body or various environments and appear to penetrate and accumulate in different tissues (Liu *et al.*, 2008). They are thought to strongly interact with various protein and nucleic structures and could either enhance or limit various cellular functions (Mahmood *et al.*, 2010).

The physico-chemical characteristics of NPs play a significant role in their effect on biological systems (Donaldson *et al.*, 2004; Oberdörster *et al.*, 2000). The principal parameters of nanoparticles are their shape, size, surface area and the morphological sub-structure of the substance. The chemical composition and the intrinsic toxicological properties of the chemical are also of importance for the toxicity of NPs (Renwick *et al.*, 2004). Thus, physico-chemical characterization of NPs is paramount in order to correlate biological/toxicological responses with these properties (Warheit, 2008).

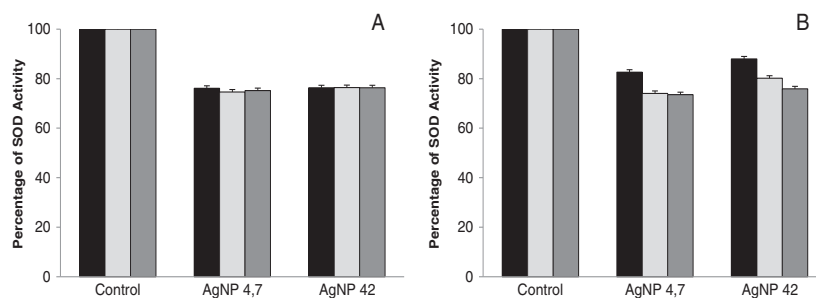




**Figure 6.** Time course of reactive oxygen species (ROS) production in untreated HepG2 (A) cells (Δ) and treated with silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 (◆) or AgNPs of 42 nm (◼). (B) Untreated HL-60 cells (Δ) and treated with AgNPs of 4.7 nm (◆) and 42 nm (◼). Asterisks indicate a significant difference from the control \*\* $P \leq 0.01$  and \*  $P \leq 0.05$ .



**Figure 7.** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 and 42 nm in the total glutathione content on HepG2 (A) and HL-60 (B) cells. Cells were cultured with 24-h MTT  $EC_{50}$  doses of AgNPs for 24 (■), 48 (◻) and 72 (◼) h. Control untreated cells. Asterisks indicate a significant difference from the control \*\* $P \leq 0.01$  and \* $P \leq 0.05$ .



**Figure 8.** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) 4.7 and 42 nm in the superoxide dismutase (SOD) activity on HepG2 (A) and HL-60 (B) cells. Cells were cultured with 24-h MTT  $EC_{50}$  doses of AgNPs for 24 (■), 48 (◻) and 72 (◼) h.

When investigating the size-dependent effects, the size distribution of the NPs in relevant cell culture media needs to be described. In addition, agglomeration of NPs has been demonstrated to have a profound impact on their toxicity *in vitro*

(Liu et al., 2009). In our research, the size measurement of AgNPs 4.7 and 42 nm by TEM showed in aqueous solution a diameter of  $5.5 \pm 2.77$  nm (SE) and  $41.06 \pm 9.29$  nm (SE), respectively (Table 2). These results agree well with the particle size in the different

AgNPs specified by the manufacture (Table 1). However, after incubation on HepG2 and HL60 media, the diameter of AgNPs of 4.7 nm increased to 106.2 and 101 nm, respectively, using DLS technique. The AgNPs of 42 nm also after incubation on HepG2 and HL60 media, the diameter increased to 126.5 and 102.3 nm, respectively (Table 2). The size distributions of particles suspended in DMEM and RPMI media, measured by DLS analysis, showed larger values than the particle size measured by TEM. This shows that the AgNPs formed agglomerates in the cell medium, which were around 20 times larger than the primary particle sizes (4.7 nm). The AgNPs of 42 nm formed larger agglomerates, around three times the size estimated by TEM analysis. That indicates the possible interaction of AgNPs with the cell culture media, which has been widely reported with different NPs that leads to the formation of 'protein corona' (Lundqvist *et al.*, 2008; Lynch and Dawson, 2008). Therefore, not only the size of the primary NPs but also the size of the secondary NPs could be used as a characteristic parameter to determine the *in vitro* toxicity of NPs in a cell culture medium (Kato, 2011).

After physicochemical characterization, a series of toxicological studies were performed to assess the *in vitro* cytotoxic effects of AgNPs of 4.7 and 42 nm on these two human cell lines and to understand the difference in the cellular response to AgNPs.

The MTT assay determines the ability of viable cell's mitochondria to reduce the soluble, yellow MTT into an insoluble, purple formazan. The reduction of MTT to formazan indicates the decrease in mitochondrial metabolism of the cells. A dose response of both AgNPs in HepG2 and HL-60 cells showed the decrease in the reduction of MTT to formazan with the increasing concentration. In addition, the dose response of AgNPs to HepG2 and HL-60 cells in the LDH assay showed that with the increasing concentrations of both AgNPs, more LDH was released to the culture medium, which indicated the cellular viability was decreasing with the increasing concentrations of AgNPs (Figs 4 and 5).

The toxicity of AgNPs of 4.7 nm was compared with that of various corresponding concentrations of AgNPs of 42 nm. Based upon the EC<sub>50</sub> values determined by the two cytotoxicity assays, AgNPs of 4.7 nm and 42 nm exhibited a dramatic difference in cytotoxicity. Small AgNPs (4.7 nm) were much more cytotoxic than large NPs (42 nm). On HepG2, AgNPs of 42 nm exhibited an EC<sub>50</sub> value of 83.1 and 65.8 µg mL<sup>-1</sup> (MTT/LDH, respectively), whereas the EC<sub>50</sub> AgNPs of 4.7 nm was 2.3 and 2.2 µg mL<sup>-1</sup> (MTT/LDH, respectively) about 40-fold more cytotoxic. On HL-60, AgNPs of 4.7 nm exhibited an EC<sub>50</sub> value of 9.46 and 8.64 µg mL<sup>-1</sup> (MTT/LDH, respectively), about 44-fold more cytotoxic than AgNPs of 42 nm.

Taken together, the responses from both cytotoxicological assays (MTT and LDH) employed to test the AgNPs (4.7 and 42 nm) toxicity on the HepG2 and HL-60 cells were found to be both dose and size dependant. Particle size has been demonstrated to influence toxicity (Cha *et al.*, 2008; Hsin *et al.*, 2008), tissue distribution (De Jong *et al.*, 2008), intestine and dermal penetration (Sonavane *et al.*, 2008) and cellular uptake (Chithrani *et al.*, 2006). In general, greater effects were observed for smaller NPs. Accordingly, smaller NPs have a wider tissue distribution, penetrate further within the skin and intestine, are internalized to a greater extent and have a larger toxic potency (Johnston *et al.*, 2010). There are few studies about cellular uptake, but all of them agree that the size and surface charge of the NPs are factors that influence the potential cellular uptake (Chithrani *et al.*, 2006; Elsaesser and Howard, 2012; Wang *et al.*, 2010). Although various studies indicate that the final localization of NPs is usually the lysosome (Clift *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2010), the internalization

mechanism is not fully understood (Iversen *et al.*, 2011). However, it has been suggested that it is possible that different internalization mechanisms exist for the different NP sizes, although this will need further clarification (Varela *et al.*, 2012)\*.

Furthermore, in the present study the difference in the cellular response to AgNPs was also compared. Our results showed the higher sensitivity of HepG2 cells to the AgNPs than HL-60 cells, about 4.5-fold (Table 3). Johnston *et al.* (2010) reported that the liver appears to be the primary site of accumulation, which is likely to derive from the uptake of particles by resident liver macrophages, contained within the reticuloendothelial system, which remove particles from the circulation. Thus, this could explain the greater susceptibility of HepG2 cells. Kim *et al.* (2009) also studied the cytotoxicity of AgNPs on HepG2 cells. HepG2 showed a strong sensitivity to treatment with AgNPs (EC<sub>50</sub> was 3.38 µg mL<sup>-1</sup> by the MTT assay and 0.53 µg mL<sup>-1</sup> by LDH). Other authors have compared the cytotoxicity of AgNPs on different tumor cells lines, such as Arora *et al.* (2008). They evaluated the cytotoxic effect of AgNPs on human fibrosarcoma (HT-1080) and human skin carcinoma (A431) cells. However, their cytotoxicity results did not show a difference between both cell lines.

Among both colorimetric-based short-term exposure (up to 72 h) acute toxicity assays (MTT and LDH) in HepG2 and HL-60 cells, the LDH assay was noted to be the most sensitive as indicated by the lower EC<sub>50</sub> (Table 3). Which could suggests that cell membrane integrity is more readily affected by AgNPs than the tested metabolic activities. According to our results, Kim *et al.* (2009) found that the EC<sub>50</sub> of AgNPs determined by the LDH assay was lower than that calculated from the data collected using the MTT assay on HepG2 cells.

It has been suggested that the general trend of NP cytotoxicity is similar among various types of NPs (Jin *et al.*, 2008) and that non-specific oxidative stress is one of the largest concerns in NP-induced toxicity (Colvin, 2003; Nel *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2006). Consistent with these findings, our results showed that the cytotoxicity induced by AgNPs (4.7 and 42 nm) was efficiently prevented by NAC treatment (Fig. 5). These findings suggest that oxidative stress is primarily responsible for the cytotoxicity of AgNPs. A number of previous studies have implicated the production of ROS in cytotoxicity mediated by NPs (Foldbjerg *et al.*, 2009). In our study, a fluorogenic assay was used to measure the production of ROS at different times. AgNPs of 4.7 nm induced a drastic increase in ROS production on HepG2 cells and HL-60 cells after 15 min (100%) and 24 h (60%), respectively. However, AgNPs of 42 nm induced a lower ROS production on both cell lines after 24 h than AgNPs of 4.7 nm. Thus, ROS production on HepG2 and HL-60 was also dependent of the particle size. Barillet *et al.* (2010) reported that Silicon Carbide nanoparticles (SiC-NPs) diameter modulate ROS production. This modulation has also already been described with TiO<sub>2</sub>-NPs and CB-NPs and attributed to higher surface area and thus a higher surface reactivity of the finest NPs (Hussain *et al.*, 2009).

Therefore, to investigate the potential role of oxidative stress as a mechanism of AgNPs induced toxicity, the effects on total glutathione content and SOD were monitored. GSH is the major endogenous antioxidant scavenger that protects cells from oxidative stress through its ability to bind and reduce ROS. Thus, preserving the GSH-mediated antioxidant defense is critical for cell survival (Anderson *et al.*, 2004; Dewarjee *et al.*, 2009; Sies, 1999). Our results showed a drastic depletion of total glutathione content after 72 h of treatment with both AgNPs sizes in HepG2/HL-60 cells (84–98%). Other authors such as Arora *et al.* (2008), Carlson *et al.* (2008) and Piao *et al.* (2011) also observed

decreased levels of GSH after treatment with AgNPs. The intracellular GSH measurement study by Mukherjee *et al.* (2012) also showed a decrease in the intracellular GSH level with the increasing concentration of AgNPs in HaCaT and HeLa cells, with HeLa cells being much more sensitive than HaCaT cells. Therefore, it remains to be determined if the other intracellular antioxidant system such as superoxide dismutase is also impaired by AgNPs. In this study, the changes observed in the activity of SOD were not statistically significant in both cells lines (HepG2 and HL-60) after treatment with AgNPs 4.7 and 42 nm. This result is suggestive of a differential and less pronounced response by these cellular defense mechanisms as compared with GSH. Arora *et al.* (2009) did not observe changes statistically significant in the levels of SOD on fibroblast after treatment with AgNPs. But nevertheless, in case of primary liver cells they observed an increase of SOD after treatment with AgNPs.

In conclusion, our study showed that both AgNPs sizes (4.7 and 42 nm) formed agglomerates in the cell media. Small AgNPs were much more cytotoxic than large AgNPs and HepG2 cells showed a higher sensitivity to the AgNPs than HL-60 cells. In addition, the cytotoxicity induced by AgNPs was efficiently prevented by NAC treatment, which suggests that oxidative stress could be responsible for the cytotoxicity of AgNPs. Cellular antioxidant status was disturbed: AgNPs exposure caused ROS production, total glutathione content depletion and slight but not statistically significant inactivation of SOD.

#### Acknowledgments

This work has been supported by Grant AGL2010-16561 from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). A. Ávalos is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). We would also like to thank the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain for use the DLS equipment.

#### Conflict of Interest

The authors did not report any conflict of interest.

#### References

- Ahamed M, Siddiqui MKJ. 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clin. Chim. Acta* **383**: 57–64.
- Albanese A, Sykes EA, Chan WC. 2010. Rough around the Edges: The inflammatory response of microglial cells to spiky nanoparticles. *ACS Nano* **4**: 2490–2493.
- Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS, Sims NR. 2004. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci. Lett.* **354**: 163–165.
- Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. *Toxicol. Lett.* **179**: 93–100.
- Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. 2009. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**: 310–318.
- Barnard AS, Xu HF. 2008. An environmentally sensitive phase map of titania nanocrystals. *ACS Nano* **2**: 2237–2242.
- Barillet S, Jugan ML, Laye M, Leconte Y, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carrère M. 2010. *In vitro* evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: cytogenotoxicity and oxidative stress. *Toxicol. Lett.* **198**: 324–330.
- Boucher W, Stern JM, Kotsianyan V, Kempuraj D, Papaliodis D, Cohen MS, Theoharides TC. 2008. Intravesical nanocrystalline silver decreases experimental bladder inflammation. *J. Urol.* **179**: 1598–1602.
- Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* **112**: 13608–13619.
- Cha K, Hong HW, Choi YG, Lee MJ, Park JH, Chae HK, Ryu G, Myung H. 2008. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol. Lett.* **30**: 1893–1899.
- Chen X, Schluesener HJ. 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* **176**: 1–12.
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake by mammalian cells. *Nano Lett.* **6**: 662–668.
- Clift MJD, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, Guy K, Stone V. 2008. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **232**: 418–427.
- Commission recommendation of October 18<sup>th</sup> 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Off. J. Eur. Union* **275**: 38–40.
- Colvin VL. 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. Biotechnol.* **21**: 1166–1170.
- De Jong WH, Hagens WJ, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. 2008. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* **29**: 1912–1919.
- Dewarijee S, Maiti A, Sahu R, Dua TK, Mandal V. 2009. Effective control of type 2 diabetes through antioxidant defense by edible fruits of *Diospyros peregrina*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2011**: 1–7.
- Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. 2004. Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* **61**: 727–728.
- Elsaesser A, Howard CV. 2012. Toxicology of nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **69**: 129–137.
- Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* **190**: 156–162.
- García A, Morales P, Arranz N, Delgado E, Rafter J, Haza AI. 2008. Induction of apoptosis and reactive oxygen species production by *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosodibutylamine in human leukemia cells. *J. Appl. Toxicol.* **28**: 455–465.
- Henig RM. 2007. Our silver-coated future. *Onearth Fall*: 23–29.
- Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* **179**: 130–139.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. 2005. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro* **19**: 975–983.
- Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, Billon-Galland MA, Fleury-Feith J, Moisan F, Paire JC, Marano F. 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* **260**: 142–149.
- Iversen TG, Skotland T, Sandvig K. 2011. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **6**: 176–185.
- Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. 2008. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem. Res. Toxicol.* **21**: 1871–1877.
- Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. 2010. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **40**: 328–346.
- Jos A, Pichardo S, Puerto M, Sánchez E, Gribo A, Camean AM. 2009. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol. In Vitro* **23**: 1491–1496.
- Kato H. 2011. *In vitro* assays: Tracking nanoparticles inside cells. *Nat. Nanotechnol.* **6**: 139–140.
- Kim HR, Kim MJ, Lee SY, Oh SM, Chung KH. 2011. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutat. Res.* **726**: 129–135.
- Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K, Park K, Yi J, Ryu D. 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro* **23**: 1076–1084.
- Liu Z, Davis C, Cai W, He L, Chen X, Dai H. 2008. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 1410–1415.
- Liu S, Wei L, Hao L, Fang N, Chang MW, Xu R, Yang Y, Chen Y. 2009. Sharper and faster “nano darts” kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano* **3**: 3891–3902.

- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cerdevall T, Dawson K. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 14265–14270.
- Lynch I, Dawson K. 2008. Protein-nanoparticle interactions. *Nanotoday* **3**: 40–47.
- Mahmood M, Casciano DA, Mocan T, Iancu C, Xu Y, Mocan L, Iancu DT, Dervishi E, Li Z, Abdalmuhsen M, Biris AR, Ali N, Howard P, Biris AS. 2010. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. *J. Appl. Toxicol.* **30**: 74–83.
- Maurer-Jones MA, Lin YS, Haynes CL. 2010. Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano* **4**: 3363–3373.
- Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdorster G, Philbert MA, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle SS, Walker NJ, Warheit DB. 2006. Safe handling in nanotechnology. *Nature* **444**: 267–269.
- Mukherjee SG, O'Clonadh N, Casey A, Chambers G. 2012. Comparative *in vitro* cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cells lines. *Toxicol. In Vitro* **26**: 238–251.
- Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol. Sci.* **101**: 239–253.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**: 622–627.
- Oberdorster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder ACP. 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* **96**: 5–74.
- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **113**: 823–839.
- Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol. Lett.* **201**: 92–100.
- Porter AE, Gass M, Bendall JS, Muller K, Goode A, Skepper JN, Midgley PA, Welland M. 2009. Uptake of noncytotoxic acid-treated single-walled carbon nanotubes into the cytoplasm of human macrophage cells. *ACS Nano* **3**: 1485–1492.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. 2004. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup. Environ. Med.* **61**: 442–446.
- Savage N, Thomas TA, Duncan JS. 2007. Nanotechnology applications and implications research supported by the US Environmental Protection Agency STAR grants program. *J. Environ. Monit.* **9**: 1046–1054.
- Sayes MC, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* **92**: 174–185.
- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 916–921.
- Sonavane G, Tomoda K, Sano A, Ohshima H, Terada H, Makino K. 2008. *In vitro* permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Coll. Surf. B. Biointerfaces* **65**: 1–10.
- Stickler DJ. 2000. Biomaterials to prevent nosocomial infections: is silver the gold standard? *Curr. Opin. Infect. Dis.* **13**: 389–393.
- Tripathy A, Chandrasekran N, Raichur AM, Mukherjee A. 2008. Antibacterial applications of silver nanoparticles synthesized by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. *J. Biomed. Nanotech.* **4**: 1–6.
- Varela JA, Bexiga MG, Aberg C, Simpson JC, Dawson K. 2012. Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *J. Nanobiotechnology* **10**: 39–44.
- Wang SH, Lee CW, Chiou A, Wei PK. 2010. Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *J. Nanobiotechnology* **8**: 33–45.
- Warheit DB. 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization. *Toxicol. Sci.* **101**: 183–185.
- Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE. 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* **6**: 1794–1807.
- Xiao Y, Forry SP, Gao X, Holbrook RD, Telford WG, Tona A. 2010. Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *J. Nanobiotechnology* **8**: 13.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 6–20.



## Artículo III

---

### **Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts**

**International Wound Journal (2016), 13: 101-109**







## ORIGINAL ARTICLE

## Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts

Alicia Avalos, Ana I Haza, Diego Mateo &amp; Paloma Morales

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

**Key words**

Cytotoxicity; Normal human dermal fibroblasts; Reactive oxygen species; Silver nanoparticles

**Correspondence to**

P Morales  
 Departamento de Nutrición, Bromatología y  
 Tecnología de los Alimentos  
 Facultad de Veterinaria  
 Universidad Complutense de Madrid  
 28040 Madrid  
 Spain  
 E-mail: pmorales@vet.ucm.es

doi: 10.1111/iwj.12244

Avalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. *Int Wound J* 2016; 13:101–109

**Abstract**

Silver compounds have been used for their medicinal properties for centuries. At present, silver nanoparticles (AgNPs) are reemerging as a viable topical treatment option for infections encountered in burns, open wounds and chronic ulcers. This study evaluated the in vitro mechanisms of two different sizes of AgNPs (4.7 and 42 nm) toxicity in normal human dermal fibroblasts. The toxicity was evaluated by observing cell viability and oxidative stress parameters. In all toxicity endpoints studied (MTT and lactate dehydrogenase assays), AgNPs of 4.7 nm were much more toxic than the large AgNPs (42 nm). The cytotoxicity of both AgNPs was greatly decreased by pre-treatment with the antioxidant N-acetyl-L-cysteine. The oxidative stress parameters showed significant increase in reactive oxygen species levels, depletion of glutathione level and slight, but not statistically significant inactivation of superoxide dismutase, suggesting generation of oxidative stress. Thus, AgNPs should be used with caution for the topical treatment of burns and wounds, medical devices etc, because their toxicity depends on the size, the smaller NPs being much more cytotoxic than the large.

**Introduction**

The prefix 'nano' is derived from the Greek word 'nanos' meaning 'dwarf'. Nanotechnology involves the manipulation and application of engineered particles or systems that have at least one dimension less than 100 nanometres (nm) (1). On 18 October 2011, the European Commission defined 'nanomaterial' as 'a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm–100 nm'. Application of this novel technology is now widely spread throughout all areas of life and still expanding. With the reduction in their size and concomitant increase in their specific surface area per unit mass, the nanoparticles (NPs) possess unique physico-chemical properties, which have led to these small objects becoming attractive and useful research and production units (2).

However, the same characteristic making NPs so attractive to be used in new products have led to concerns that NPs may pose a risk for humans and the environment (3). So, an improved understanding of the potential risks comprising exposure and hazard assessments, associated with exposure to nanomaterials

is necessary (4) to check their toxicity or safety. Toxicological investigations of NPs imply that size, shape, chemical composition, surface charge, solubility, their ability to bind and affect biological sites as well as their metabolism and excretion influence the toxicity of NPs (5,6). For example, NPs of smaller size can enter the mitochondria of cells through various pathways, subsequently inducing oxidative stress and cell death via apoptosis (7). This is also reflected in a scientific opinion by the European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee who concluded from the existing studies that NPs might

**Key Messages**

- silver nanoparticles (AgNPs) are used for the treatment of wounds and burns, and little is known about their toxicity
- in this study, the cytotoxic effect of AgNPs of different sizes (4.7 and 42 nm) on normal human dermal fibroblasts was evaluated
- the results showed a size-dependent toxicity. This toxicity may be due to oxidative stress, as the cellular antioxidant status was disturbed



**Table 1** Characteristics of silver nanoparticles (AgNPs) obtained from Nanogap

| Code   | Particles | Average* $\pm$ SD (nm) | Dispersion solution               | Density (g/ml) | Density of particle (part/l) | Colour                       | pH  |
|--------|-----------|------------------------|-----------------------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|-----|
| 2106-W | AgNP 4-7  | 4.7 $\pm$ 1            | Aqueous solution with PEI and PVP | 1.024          | 1.75 $\times 10^{19}$        | Black, yellow (when diluted) | 9.3 |
| 2103-W | AgNP 42   | 42 $\pm$ 9             | Aqueous solution                  | 1.01           | Nd                           | Brown                        | Nd  |

Nd, no information provided; PEI, polyetherimide; PVP, polyvinylpyrrolidone.

\*As provided by company.

have different toxicological properties than the bulk substance, but their risks should be assessed on a case-by-case basis (8).

It is estimated that of all the nanomaterials used in consumer products, silver nanoparticles (AgNPs) currently have the highest degree of commercialisation (9). Owing to their strong antibacterial property, AgNPs are largely used as a component of various commercially available products such as textiles, medical devices, contraceptives, water disinfectants and room spray (10–12). Moreover, AgNPs are used for the treatment of wounds and burns, as well as for coating on implants (13). Despite the increasing use of AgNPs in commercial products, little is known about the toxicity and cellular responses to AgNPs, and therefore the potential impacts of AgNPs on human and environmental health.

Because of the extensive presence of AgNPs in textiles, wound dressing, sport clothing and other products that come in direct contact with the skin, dermal exposure must be carefully evaluated. Some authors suggested an increased dermal penetration of AgNPs associated with damaged skin during *in vitro* experiments (14) or following the use of AgNPs-coated dressings in case of extensive burns (15). Keratinocytes in culture were used to assess the cytotoxic effects of AgNPs released from several types of silver-containing dressings, and the result of these studies showed that keratinocyte proliferation was significantly inhibited after exposure to extracts of nanocrystalline-coated dressings (16,17). The toxicity of AgNPs has also been investigated in others cell types, including BRL3A rat liver cells (18), PC-12 neuroendocrine cells (19), human alveolar epithelial cells (20) and germline stem cells (21). The toxicity of AgNPs is mainly due to oxidative stress (22). AgNPs were reported to act via reactive oxygen species (ROS) generation and glutathione depletion (18). The depletion of antioxidants including glutathione and protein-bound sulphydryl groups and the increase in activity of various antioxidant enzymes indicative of lipid peroxidation have been implicated in oxidative damage of cell molecules (23).

For *in vitro* studies with AgNPs, the selection of cell types representing the target tissue is very important. Assessment of human fibroblast cytotoxicity *in vitro* has been a useful tool for characterising cell toxicity of topically applied antiseptics (24). In this study, normal human dermal fibroblasts (NHDF) have been used because it is relevant to consider the implications of dermal exposure to AgNPs, due to exploitation of these NPs within wound dressings (25).

The main goal of the present work was to study how AgNPs of different sizes (4.7 and 42 nm) interact with normal human dermal fibroblast in order to understand the impact of such nanomaterials on cellular biological functions. In addition, total

glutathione content, activity of superoxide dismutase (SOD) and ROS generation were used to evaluate feasible mechanisms by which AgNPs exerted their toxicity.

## Material and methods

### Chemicals

All chemicals were reagent-grade or higher and were obtained from Sigma–Aldrich (St Louis, MO), unless otherwise specified. Water-based solutions of AgNPs of 4.7 and 42 nm in diameter were purchased from Nanogap Subparticles (A Coruña, Spain). A summary of the characterisation according to the manufacturer's data is available in Table 1. Stock solutions of AgNPs were diluted to the required concentrations using the respective cell culture medium. N-acetyl-L-cysteine (NAC) was purchased from Sigma–Aldrich.

### Characterisation of nanoparticles

The characterisation of AgNPs to determine their primary sizes and their morphology in aqueous solution by transmission electron microscopy (TEM) was conducted in previous studies (26). Dynamic light scattering (DLS) was used for characterisation of hydrodynamic size of AgNPs after incubation in cell-free culture media (0.02% v/v) for 24 hours at 37°C, performed on a Malvern Instruments Zetasizer Nano-ZS from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain, as described by Murdock *et al.* (27). The method yields a hydrodynamic diameter, which is calculated particle diameter of a sphere that has the same measured motion in the solute as the actual particle.

### Cell culture

NHDF were purchased from commercial PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany). NHDF were cultured as monolayer in Fibroblast Basal medium supplemented with 2% v/v foetal calf serum, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor and 5  $\mu$ g/ml insulin. Culture medium and supplements were purchased from PromoCell GmbH. The human cell culture was incubated at 37°C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Cytotoxicity endpoints

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] reduction and lactate dehydrogenase (LDH) leakage were used as parameters for cytotoxicity assessment. The MTT assay was assessed according to the manufacturer's

instructions (Cell Proliferation Kit I; Roche, Indianapolis, IN). Briefly, NHDF ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were plated onto multiwell systems and incubated for 24 hours. After seeding, 100  $\mu$ l of different concentrations of AgNPs (0.84–2000  $\mu$ g/ml) or negative (without AgNPs) and positive controls [20 mM of N-nitrosodibutylamine, NDBA, 5% cell viability; (28)] were added to the wells and the plates were incubated for 24, 48 and 72 hours at 37°C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In order to reduce agglomeration, the AgNPs suspensions were mixed using vortex for 20 seconds and sonicated for 30 minutes. The optical density (OD) of each well was read at 620 nm (test wavelength) and 690 nm (reference wavelength) by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a built-in software package for data analysis (iEMS Reader MF, LabSystems; Helsinki, Finland).

The percentage of cell survival [% succinate dehydrogenase (SDH)] is defined as the ratio of the number of cells in the presence of AgNPs to the number in the absence of AgNPs; that is, %SDH activity =  $(A_1/A_0) \times 100$ , where  $A_1$  is the absorbance of the cells exposed to the AgNPs and  $A_0$  is the absorbance of the negative control. All the concentrations were tested in 12 replicates and values presented in this article are mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

Membrane integrity was assessed by measuring extracellular LDH according to the procedures described in manufacturer's instructions [Cytotoxicity Detection Kit (LDH)]. Briefly, NHDF were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml culture medium. After 24 hours of seeding, 100  $\mu$ l of different concentrations of AgNPs (0.84–2000  $\mu$ g/ml) or negative and positive controls were added to the wells and the plates were incubated for 24, 48 and 72 hours at 37°C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In order to reduce agglomeration previously, the AgNPs suspensions were mixed using vortex for 20 seconds and sonicated for 30 minutes. Cell-free culture media was collected from each well and incubated with a reaction mixture for 30 minutes. The plates were read with a microplate reader at 490 nm. A solution of 2% Triton X-100, which lead to 100% cytotoxicity through cell lysing and thus to maximum LDH leakage, was used as a positive control.

The release of LDH leakage was calculated as follows: LDH leakage (%) =  $(\text{experimental value} - \text{untreated control}) / (\text{positive control} - \text{untreated control}) \times 100$ . All the concentrations were tested in 12 replicates and values presented in this article are mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

Results obtained by the MTT and LDH assays were also expressed as EC<sub>50</sub> values. The EC<sub>50</sub> values represent the effective concentration of AgNPs that decreases the amount of viable cells to 50% of the maximum.

#### Protective effect of NAC against AgNPs-induced cytotoxicity

NAC is an important antioxidant and serves as a precursor for the synthesis of glutathione (29). The protective effect of NAC against AgNPs-induced cytotoxicity was evaluated using the MTT assay. Briefly, NHDF were pre-treated for 2 hours with NAC at different concentrations (1, 5, 10 and 20 mM) prior to a 24-hour treatment with the EC<sub>50</sub> (concentration of AgNPs

yielding 50% growth inhibition) of the corresponding AgNPs calculated by MTT assay. Then, the procedure is similar to the MTT assay described above.

#### Intracellular ROS measurement

ROS production was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) from Molecules Probes (Eugene, OR). H<sub>2</sub>DCFDA diffuses through the cell membrane and is hydrolysed by esterases to non-fluorescent dichlorofluorescein (DCFH). In the presence of ROS, this compound is oxidised to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF). For these experiments, NHDF were seeded in 24-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/ml culture medium. After seeding, 1 ml of AgNPs of 4.7 (3.36  $\mu$ g/ml) and 42 nm (100  $\mu$ g/ml) or positive control (20 mM NDBA, 90% ROS production; (28)) were added to the wells and the plates were incubated for 48, 24, 3 hours, and 30 and 15 minutes. Previously, we performed the assay with different concentration of AgNPs of 4.7 and 42 nm to select the highest ROS production. However, with AgNPs significant ROS production could only be measured at the lower concentrations. Then,  $2 \times 10^5$  cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) loaded for 30 minutes with H<sub>2</sub>DCFDA (10  $\mu$ M) and incubated in a water bath (37°C). Cells were kept on ice and fluorescence intensity was read immediately with a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and the CellQuest software (Centro de Microscopía y Citometría, UCM, Madrid, Spain). For each experiment, 10<sup>4</sup> cells were analysed.

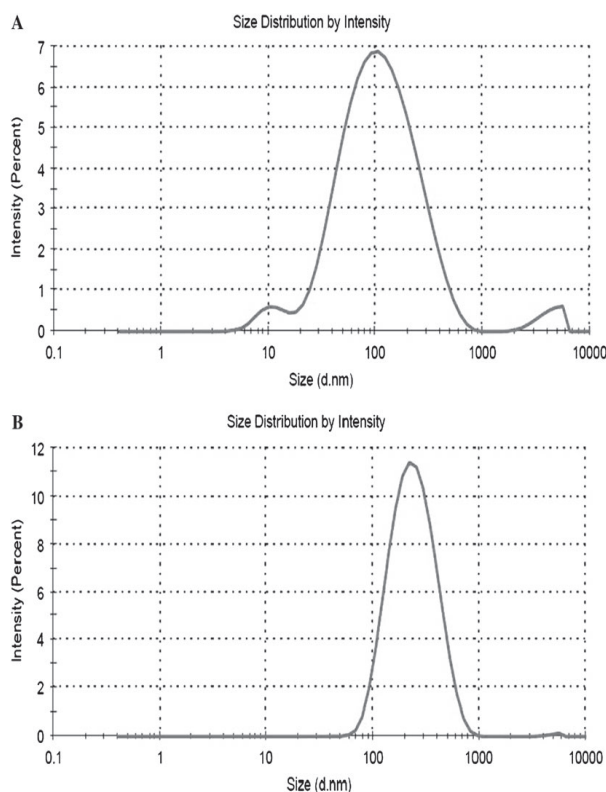
#### Total glutathione content

The total glutathione content was measured using a commercial colorimetric assay kit, OxiSelect Total Glutathione (GSSG/GSH; Cell Biolabs, Inc.; San Diego, CA). The assay was assessed according to the manufacturer's instructions. Briefly, NHDF were treated with 24 hours MTT EC<sub>50</sub> of the corresponding AgNPs for 24, 48 and 72 hours. After treatment, cells were centrifuged and washed with cold 1 $\times$  PBS. The pellet was resuspended with 200–500  $\mu$ l ice-cold 0.5% metaphosphoric acid (MPA), the cells were again centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes at 4°C and the supernatant was collected. Then, 25  $\mu$ l 1 $\times$  glutathione reductase and 25  $\mu$ l 1 $\times$  NADPH were added in 96-well plate and after that 100  $\mu$ l of the samples were added. Finally, 50  $\mu$ l 1 $\times$  chromogen was added and mixed briefly. Immediately, the absorbance was recorded at 405 nm at 2 minutes intervals for 10 minutes.

The total glutathione content was determined by comparison with the predetermined glutathione standard curve. The results were expressed as percentage of total glutathione (GSSG/GSH) content.

#### SOD activity

SOD activity was measured using a commercial colorimetric assay kit, OxiSelect Superoxide Dismutase Activity (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA). Briefly, NHDF were treated with 24 hours MTT EC<sub>50</sub> of the corresponding AgNPs for 24, 48 and 72 hours. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS



**Figure 1** Dynamic light scattering (DLS) size distributions for 24 hours incubations of silver nanoparticles (AgNPs) 4.7 nm (panel A) and AgNPs 42 nm (panel B) in normal human dermal fibroblasts (NHDF) media.

and then were incubated on ice with 1× Lysis Buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) for 10 minutes. Later, cells were centrifuged at 12 000g for 10 minutes and the cell lysate supernatant was collected and added (10 µl) to 96-well plate and then the master mixture was added. Finally, 10 µl 1× Xanthine Oxidase Solution was added and immediately the absorbance was read at 490 nm.

The results were expressed as percentage of SOD activity and were calculated as follows:  $\text{SOD activity} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ , where  $A_0$  is the absorbance of the negative control and  $A_1$  is the absorbance of the cells exposed to the AgNPs.

#### Statistical analyses

All means were calculated from three independent experiments and are expressed in the graphs as mean and standard deviation. The Student's *t*-test was used for statistical comparison and differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ . Descriptive and graphical methods were used to characterise the data. All tests were performed with the software package Statgraphics Plus 5.0 (Warrenton, VA).

### Results

#### Characterisation of nanoparticles

The particle size, shape and size distribution of AgNPs of 4.7 and 42 nm in aqueous solution by TEM were conducted

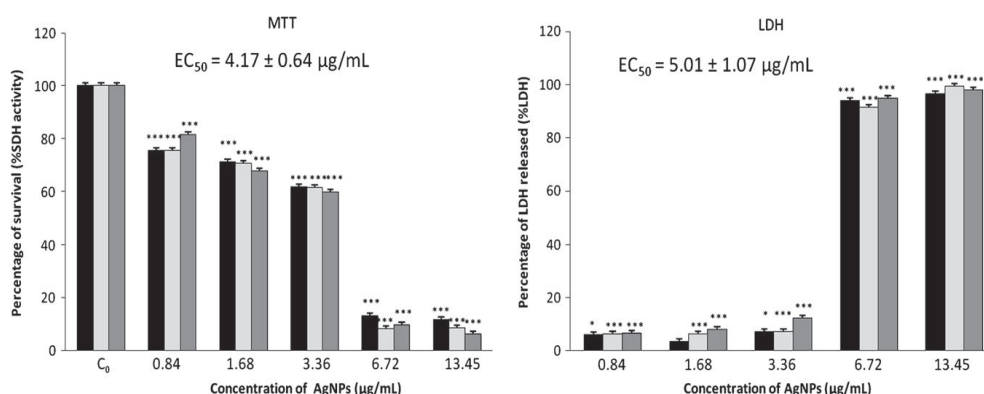
in previous studies in our laboratory (26). Results showed that majority of the AgNPs (both size) were approximately spherical, multifaceted or slightly elongated shape and well-dispersed. The size measurement of AgNPs of 4.7 and 42 nm showed a diameter of  $5.5 \text{ nm} \pm 2.77 \text{ nm}$  (SE) and  $41.06 \text{ nm} \pm 9.29 \text{ nm}$ , respectively. In this study, the particle size of the AgNPs of 4.7 and 42 nm in free culture media as imaged by DLS are shown in Figure 1. The DLS size analysis (Figure 1A) showed that AgNPs of 4.7 nm showed agglomeration in fibroblast media, with a major peak size at 138.9 nm (~94% intensity) and two minor peaks at 10.84 and 4222 nm (~3.3% and 2.7% intensity, respectively). AgNPs of 42 nm also showed agglomeration in fibroblast media, with peak size at 259.9 nm (~99.7% intensity; Figure 1B).

#### Effect of AgNPs on cellular viability

MTT and LDH leakage, two cytotoxicity markers, were used to evaluate the effects of AgNPs on cellular viability. The results of the MTT assay showed a significant decrease of NHDF cell growth when exposed to AgNPs of 4.7 nm at the concentrations of 6.72 (13%, 8% and 9% of cell survival) and 13.45 µg/ml (12%, 8% and 6% of cell survival) for all treatment times. The  $\text{EC}_{50}$  value was  $4.17 \text{ µg/ml} \pm 0.64 \text{ µg/ml}$  at 24 hours of incubation (Figure 2). In parallel, results obtained by LDH assay showed that the percentage of LDH leakage presented a strong increase at concentrations of 6.72 (93%, 91% and 94% of LDH leakage) and 13.45 µg/ml (96%, 99% and 98% of LDH

A. Avalos et al.

Silver nanoparticles and fibroblasts



**Figure 2** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) 4-7 nm on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cell viability by MTT and lactate dehydrogenase (LDH) assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▨) hours.  $C_0$  – untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $P \leq 0.001$  and \* $P \leq 0.05$ .

leakage),  $5.01 \mu\text{g/ml} \pm 1.07 \mu\text{g/ml}$  being the  $EC_{50}$  value after 24 hours of treatment.

Figure 3 shows the cytotoxic effect of AgNPs of 42 nm on NHDF cells. Data obtained by MTT assay showed a 50% reduction on cell viability after treatment with  $2000 \mu\text{g/ml}$  AgNPs for all incubation times. These results were confirmed by LDH assay. The concentration of  $2000 \mu\text{g/ml}$  AgNPs increased 52% of the LDH released, with  $EC_{50}$  value of  $1959 \mu\text{g/ml} \pm 7.39 \mu\text{g/ml}$ .

#### Protective effect of NAC against AgNPs-induced cytotoxicity

Among the multiple mechanisms that are attributed to NAC, highlights its antioxidant activity and therefore its ability to trap or react with ROS (30). AgNP-induced inhibition of MTT reduction was largely prevented by NAC (Figure 4). The viability of NHDF cells pre-treated with 20 mM NAC prior to a 24-hour treatment with 24 hours MTT  $EC_{50}$  of AgNPs of 4-7 nm increased to 100%. However, with the treatment of 24 hours MTT  $EC_{50}$  of AgNPs of 42 nm, cell viability increased to approximately 77% (5, 10 and 20 mM NAC). Thus, our results suggest that oxidative stress is primarily responsible for the cytotoxicity of AgNPs.

#### AgNP-derived induction of ROS

The generation of ROS and oxidative stress appear to be the two main mechanisms of toxicity (31). To investigate the potential role of oxidative stress induced by AgNPs, ROS generation was measured. After treatment of NHDF with AgNPs of 4-7 and 42 nm, DCF fluorescence was measured by flow cytometry and expressed as percentage of control. A significant increase of ROS levels was observed after treatment with AgNPs of 4-7 ( $3.36 \mu\text{g/ml}$ ) and 42 nm ( $100 \mu\text{g/ml}$ ), reaching the maximum signal after 3 and 24 hours treatment, respectively. ROS levels increased 2.41-fold (AgNPs of 4-7 nm) and 1.76-fold (AgNPs of 42 nm) more than the control (Figure 5).

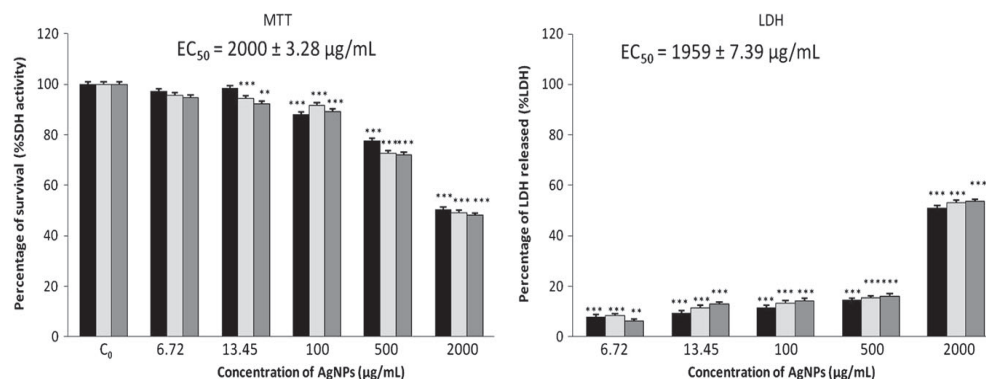
#### Cellular antioxidant response

The action of intracellular molecular antioxidants (glutathione) and regulation of antioxidant enzymes activity, such as SOD are shown in Figures 6 and 7. Our data demonstrated that a significant depletion ( $P < 0.01$ ) of total glutathione content (GSSG/GSH) occurred in AgNPs (4-7 and 42 nm)-exposed cells. Total glutathione content (GSSG/GSH) in NHDF exposed to 24 hours MTT  $EC_{50}$  of AgNPs of 4-7 nm, reduced approximately to 5% relative to control, for 24, 48 and 72 hours (Figure 6). The treatment with 24 hours MTT  $EC_{50}$  of AgNPs of 42 nm depleted GSSG/GSH to 29.5% (24 hours) and 3.7% (48 and 72 hours) relative to the controls (Figure 6).

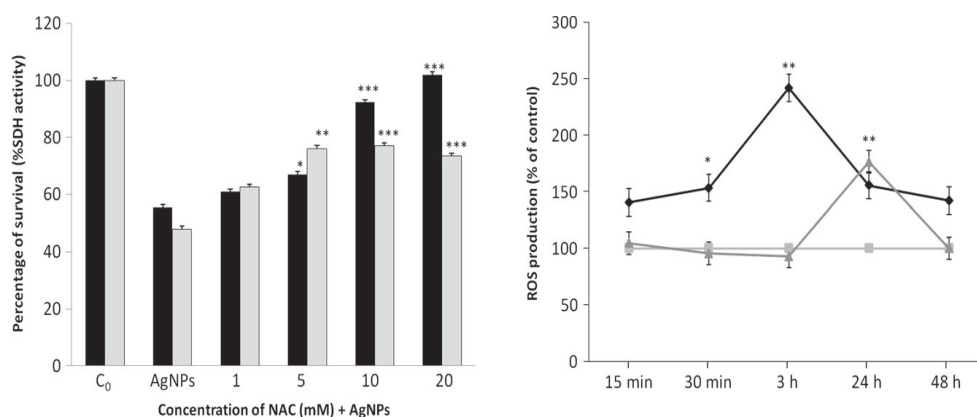
The activity of antioxidant enzymes was also modulated (Figure 7). SOD activity was very slightly reduced after NHDF treatment with the 24 hours MTT  $EC_{50}$  of AgNPs of 4-7 and 42 nm for 24, 48 and 72 hours (approximately 8% and 17% relative to controls, respectively), but this reduction was not statistically significant.

#### Discussion

AgNPs have been integrated into hundreds of products that affect the daily lives of millions of people in many countries. According to the silver nanotechnology commercial inventory (SNCI) (32), only 45% of the listed products reported the NP size used in the product, ranging from 0.3 nm to 250 nm, 24 nm being the average NP size of all reported products. Their main use is for disinfection in wound care and in products such as odour-reducing clothing, acne creams and face masks. However, despite their widespread use, information on how companies synthesised the AgNPs and the characteristics of these or how they specifically integrated it into their product is lacking. Most of these products come into direct contact with skin, the largest organ of the human body, and could serve as a potential route for NP penetration. Therefore, the relationship of AgNPs in skin needs to be investigated. In the wound healing process, dermal fibroblasts are the main cell types implicated in the extracellular matrix production (33). Considering this fact,



**Figure 3** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) 42 nm on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cell viability by MTT and lactate dehydrogenase (LDH) assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▒) hours.  $C_0$  – untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $P \leq 0.001$  and \*\* $P \leq 0.01$ .



**Figure 4** Protective effects of N-acetyl-L-cysteine (NAC) against treatment with 24 hours MTT  $EC_{50}$  doses of silver nanoparticles (AgNPs) of 4-7 (■) and 42 nm (▒) in normal human dermal fibroblasts (NHDF) cell viability by MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 hours. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$  and \* $P \leq 0.05$ .

**Figure 5** Time-course of reactive oxygen species (ROS) production in untreated normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells (□) and treated with silver nanoparticles (AgNPs) of 4-7 nm (◆) or AgNPs of 42 nm (▲). Asterisks indicate significant difference from control \*\* $P \leq 0.01$  and \* $P \leq 0.05$ .

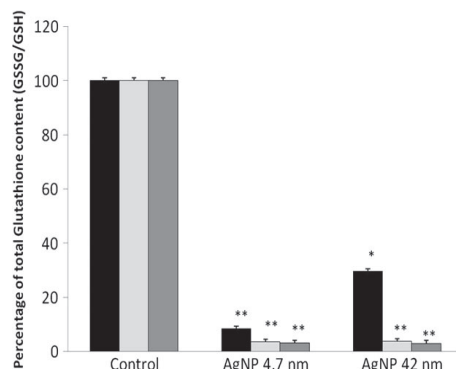
in this study we have selected NHDF cell line to evaluate the cytotoxic potential of AgNPs of various sizes.

The physico-chemical characteristics of NPs play a significant role in their effect on biological systems (34,35). The principal parameters of NPs are their shape, size, surface area and the morphological substructure of the substance. Other very important parameter is the state of agglomeration. Agglomeration is known to occur with the majority of engineered NPs with high surface activity (36). In addition, agglomeration of NPs has been demonstrated to have a profound impact on their toxicity in vitro (37). In this study, AgNPs were found to agglomerate within NHDF culture media (Figure 1). After incubation on NHDF media, the diameter of AgNP 4-7 nm increased to 138.9 nm, which was around 29 times larger than the primary particle sizes obtained using DLS technique. The diameter of AgNP 42 nm also increased to 259.9 nm after incubation

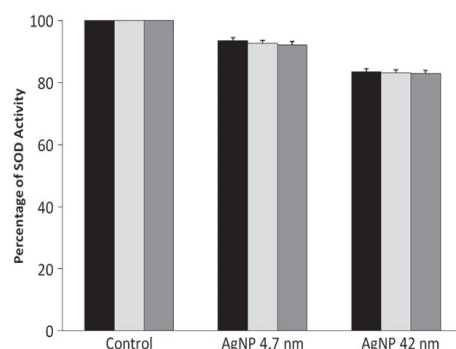
on NHDF media, around six times larger than the primary particle sizes. These results indicate the possible interaction of AgNPs with the cell culture media, which have been widely reported with different NPs that leads to the formation of 'protein corona' (38,39). Therefore, not only the size of the primary NPs but also the size of the secondary NPs could be used as a characteristic parameter to determine the in vitro toxicity of NPs in a cell culture medium (40).

Viability assays are vital steps in toxicology that explain the cellular response to a toxicant. Also, they give information on cell death, survival and metabolic activities. The use of several viability assays is important to determine the optimal assay to assess AgNPs toxicity; therefore, mortality of NHDF cells after AgNPs exposure was evaluated with two different assays, MTT and LDH, which use colorimetric markers to determine cell viability by assessing cell metabolism. The two assays showed that both AgNPs (4-7 and 42 nm) contributed to a decrease in NHDF viability. Arora *et al.* (41)





**Figure 6** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) of 4-7 and 42 nm in the total glutathione content on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells. Cells were cultured with 24 hours MTT  $EC_{50}$  doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▨) hours. Control – untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\* $P \leq 0.01$  and \* $P \leq 0.05$ .



**Figure 7** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) of 4-7 and 42 nm in the superoxide dismutase (SOD) activity on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells. Cells were cultured with 24 hours MTT  $EC_{50}$  doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▨) hours.

also observed a decrease in dermal fibroblasts viability after treatment with AgNPs of 7–20 nm. Furthermore, the AgNPs have also shown to be cytotoxic to mouse fibroblasts (L929), human fibrosarcoma (HT-1080) and normal human lung fibroblasts (IMR-90) (42–44). Viability reduction based upon the  $EC_{50}$  values was size-dependent and AgNPs of 4-7 and 42 nm exhibited a dramatic difference in cytotoxicity. Small AgNPs (4-7 nm) were much more cytotoxic than large NPs (42 nm). The AgNPs of 4-7 nm exhibited an  $EC_{50}$  value of 4-17  $\mu\text{g/ml}$  and 5-01  $\mu\text{g/ml}$  (MTT and LDH, respectively), whereas the  $EC_{50}$  AgNPs of 42 nm was 2000  $\mu\text{g/ml}$  and 1959  $\mu\text{g/ml}$  (MTT and LDH, respectively), about 400-fold less cytotoxic. According to this fact, particle size has been demonstrated to influence toxicity (31,42,45,46), tissue distribution (47), intestine and dermal penetration (48) and cellular uptake (49). In general, greater effects were observed for smaller NPs. Accordingly, smaller NPs have a wider tissue distribution, penetrate further within the skin and intestine, are internalised to a greater extent and have a larger toxic potency (25).

It has been suggested that the general trend of NP cytotoxicity is similar among various types of NPs (50) and that non-specific oxidative stress is one of the largest concerns in NP-induced toxicity (51,29,52). Consistent with those findings, our results showed that the cytotoxicity induced by AgNPs (4-7 and 42 nm) was efficiently prevented by NAC treatment (Figure 4). These findings suggest that oxidative stress is primarily responsible for the cytotoxicity of AgNPs. A number of studies have implicated the production of ROS in cytotoxicity mediated by NPs (53). In our study, a fluorogenic assay was used to measure the production of ROS at different times. The results showed that there was a significant increase in ROS after treatment with AgNPs. AgNPs of 4-7 nm induced drastic increase in ROS production on NHDF cells after 3 hours (241%). However, AgNPs of 42 nm induced a lower ROS production (176%) on NHDF cell line after 24 hours than AgNPs of 4-7 nm. Thus, ROS production on NHDF was also dependent on the particle size. Carlson *et al.* (54) observed similar results in macrophages, as smaller AgNPs (15 nm) showed the highest production ROS. It is recognised that there is a direct relationship between surface area and ROS generation capability. Smaller NPs possessed greater surface area per unit mass, leading to a larger number of atoms or molecules to be displayed on the surface instead of the interior of the particles. Therefore, lots of active sites were created on the particle surface, which could capture oxygen molecules and produce superoxide radicals as well as other kinds of ROS through dismutation (29).

To confirm the possible role of oxidative stress as a mechanism of AgNPs-induced toxicity, the effects on total glutathione content and SOD activity were monitored. GSH is an important antioxidant and ROS scavenger of the cell. Thus, preserving the GSH-mediated antioxidant defence is critical for cell survival (55–57). In our study, the total glutathione content was completely depleted in NHDF exposed to AgNPs of 4-7 and 42 nm after 72 hours (95–96%). Other authors such as Arora *et al.* (43), Carlson *et al.* (54) and Piao *et al.* (58), also observed decreased levels of GSH after treatment with AgNPs. However, the changes observed in the activity of SOD were not statistically significant in NHD after treatment with AgNPs of 4-7 and 42 nm. This result is suggestive of a differential and less pronounced response by these cellular defence mechanisms as compared with GSH. Arora *et al.* (41) did not observed statistically significant changes in the levels of SOD on fibroblast after treatment with AgNPs.

## Conclusions

Size measurement study of AgNPs in the cell culture media showed the interaction of AgNPs with the NHDF media components that suggest significant protein adsorption by the NPs in the cell growth media. Small AgNPs (4-7 nm) were found to be much more cytotoxic than large AgNPs (42 nm). In addition, the cytotoxicity induced by AgNPs was efficiently prevented by NAC treatment. This fact together with the increased generation of ROS and decreased levels of total glutathione content observed, support the hypothesis that the cells are undergoing oxidative stress, which could ultimately lead to the observed cytotoxicity. Thus, AgNPs should be used with caution for the topical treatment of burns, wounds, medical devices etc.,

because their toxicity depends on the size, the smaller NPs being much more cytotoxic than the large. Abnormal elevation of blood silver level and argyria-like symptoms following the use of AgNPs (15 nm)-coated dressings for burns were described in one clinical report (15). Elevated liver enzyme levels were also evident, insinuating that liver injury had occurred as a consequence of treatment. Hence, this case study provided evidence that silver is able to become systematically available following dermal contact.

## Acknowledgements

This work has been supported by grant AGL2010-16561 from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). AA is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). We thank the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain for the use of DLS equipment.

## References

- Hoyt VW, Mason E. Nanotechnology: emerging health issues. *J Chem Health Saf* 2008;**15**:10–5.
- Chairuangkitti P, Lawanprasert S, Roytrakul S, Aueviriyavit S, Phummiratch D, Kulthong K, Chanvorachote P, Maniratanachote R. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol In Vitro* 2013;**27**:330–8.
- Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett* 2012;**208**:286–92.
- Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdorster G, Philbert MA, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle SS, Walker NJ, Warheit DB. Safe handling in nanotechnology. *Nature* 2006;**444**:267–9.
- Castranova V. Overview of current toxicological knowledge of engineered nanoparticles. *J Occup Environ Med* 2011;**53**:14–7.
- Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Syed AF. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2010;**2**:544–68.
- Xia T, Kovachich M, Nel AE. Impairment of mitochondrial function by particle matter (PM) and their toxic components: implications for PM-induced cardiovascular and lung disease. *Front Biosci* 2007;**12**:1238–46.
- EFSA Scientific Committee. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal* 2011;**9**:2140.
- Henig RM. Our silver-coated future. *OnEarth* 2007;**23**:9.
- Vigneshwaran N, Kathe AA, Varadarajan PV, Nachane RP, Balasubramanya RHJ. Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2007;**7**:1893–7.
- Samuel U, Guggenbichler JP. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int J Antimicrob Agents* 2004;**23**:75–8.
- Gosheger G, Harges J, Ahrens H, Streitburger A, Buerger H, Erren M, Günsel A, Kemper FH, Winkelmann W, Von EC. Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model-an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials* 2004;**25**:5547–56.
- Margaret IP, Sau LL, Vincent KMP, Ivan L, Andrew B. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol* 2006;**55**:59–63.
- Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adams G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 2009;**255**:33–7.
- Trop M, Novak M, Rodl S, Hellbom B, Kroell W, Goessler W. Silver coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma* 2006;**60**:648–52.
- Paddle-Ledinek JE, Nasa Z, Cleland HJ. Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plast Reconstr Surg* 2006;**117**:110–8.
- Lam PK, Chan ES, Ho WS, Liew CT. In vitro cytotoxicity testing of a nanocrystalline silver dressing (acticoat) on cultured keratinocytes. *Br J Biomed Sci* 2004;**61**:125–7.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 2005;**19**:975–83.
- Hussain S, Javorina A, Schrand A, Duhart H, Ali S, Schlager J. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci* 2006;**92**(Suppl 2):456–63.
- Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn EK, Lim Y, Lee KH. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhal Toxicol* 2007;**19**(Suppl 1):59–65.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian stem cells. *Toxicol Sci* 2005;**88**:412–9.
- Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K, Park K, Yi J, Ryu D. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 2009;**23**:1076–84.
- Ahamed M, Siddiqui MKJ. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin Chim Acta* 2007;**383**:57–64.
- Hidalgo E, Bartolome R, Barroso C, Moreno A, Dominguez C. Silver nitrate: antimicrobial activity related to cytotoxicity in cultured human fibroblasts. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1998;**11**:140–51.
- Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* 2010;**40**:328–46.
- Avalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *J Appl Toxicol* 2013. DOI: 10.1002/jat.2957.
- Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci* 2008;**101**:239–53.
- García A, Morales P, Arranz N, Delgado E, Rafter J, Haza AI. Induction of apoptosis and reactive oxygen species production by N-nitrosopiperidine and N-nitrosodibutylamine in human leukemia cells. *J Appl Toxicol* 2008;**28**:455–65.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006;**311**:622–7.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003;**60**:6–20.
- Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 2008;**179**:130–9.
- Fauss E. *The silver nanotechnology commercial inventory*. Virginia Univ, 2008.
- Hunt TK, Hopt HW. Wound healing and infection, what surgeons and anesthesiologist can do? *Surg Clin North Am* 1997;**77**:587–606.
- Oberdorster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder ACP. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst* 2000;**96**:5–74.
- Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 2004;**61**:727–8.
- Skebo JE, Grabinski CM, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. *Int J Toxicol* 2007;**26**:135–41.
- Liu S, Wei L, Hao L, Fang N, Chang MW, Xu R, Yang Y, Chen Y. Sharper and faster "nano darts" kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano* 2009;**3**:3891–902.

A. Avalos et al.

Silver nanoparticles and fibroblasts

38. Lynch I, Dawson K. Protein-nanoparticle interactions. *Nanotoday* 2008;**3**:40–7.
39. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cerdevall T, Dawson K. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:14265–70.
40. Kato H. In vitro assays: tracking nanoparticles inside cells. *Nat Nanotechnol* 2011;**6**:139–40.
41. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;**236**:310–8.
42. Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briedé JJ, Loveren HV, Jong WH. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011;**32**:9810–7.
43. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicol Lett* 2008;**179**:93–100.
44. Asharani PV, Grace LKM, Manoor PH, Suresh V. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009;**3**:279–90.
45. Cha K, Hong HW, Choi YG, Lee MJ, Park JH, Chae HK, Ryu G, Myung H. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol Lett* 2008;**30**:1893–9.
46. Powers CM, Badireddy AR, Ryde IT, Seidler FJ, Slotkin TA. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. *Environ Health Perspect* 2011;**119**:37–44.
47. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 2008;**29**:1912–9.
48. Sonavane G, Tomoda K, Sano A, Ohshima H, Terada H, Makino K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008;**65**:1–10.
49. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake by mammalian cells. *Nano Lett* 2006;**6**:662–8.
50. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol* 2008;**21**:1871–7.
51. Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol* 2003;**21**:1166–70.
52. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JJ, Wiesner MR, Nel AE. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 2006;**6**:1794–807.
53. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett* 2009;**190**:156–62.
54. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 2008;**112**:13608–19.
55. Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS, Sims NR. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci Lett* 2004;**354**:163–5.
56. Dewarjee S, Maiti A, Sahu R, Dua TK, Mandal V. Effective control of type 2 diabetes through antioxidant defense by edible fruits of *Diospyros peregrina*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;**2009**:1–7.
57. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999;**27**:916–21.
58. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett* 2011;**201**:92–100.





## Artículo IV

---

**Effects of silver and gold nanoparticles of different sizes in human pulmonary fibroblasts.**

**Toxicology Mechanisms and Methods (2015), 25: 287-295**





## RESEARCH ARTICLE

## Effects of silver and gold nanoparticles of different sizes in human pulmonary fibroblasts

Alicia Ávalos, Ana Isabel Haza, Diego Mateo, and Paloma Morales

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

### Abstract

Silver and gold nanoparticles (Ag–AuNPs) are currently some of the most manufactured nanomaterials. Accordingly, the hazards associated with human exposure to Ag–AuNPs should be investigated to facilitate the risk assessment process. In particular, because pulmonary exposure to Ag–AuNPs occurs during handling of these nanoparticles, it is necessary to evaluate the toxic response in pulmonary cells. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* mechanisms of toxicity of different sizes of silver (4.7 and 42 nm) and gold nanoparticles (30, 50 and 90 nm) in human pulmonary fibroblasts (HPF). The toxicity was evaluated by observing cell viability and oxidative stress parameters. Data showed that AgNPs-induced cytotoxicity was size-dependent, whereas the AuNPs of the three sizes showed similar cytotoxicity. Silver nanoparticles of 4.7 nm were much more toxic than the large silver nanoparticles and the AuNPs. However, the pre-treatment with the antioxidant, *N*-acetyl-L-cysteine, protected HPF cells against treatment with Ag–AuNPs. The oxidative stress parameters revealed significant increase in reactive oxygen species levels, depletion of glutathione level and slight, but not statistically significant inactivation of superoxide dismutase, suggesting generation of oxidative stress. Hence, care has to be taken while processing and formulating the Ag–AuNPs till their final finished product.

### Keywords

Cytotoxicity, gold nanoparticles, human pulmonary fibroblasts, oxidative stress, silver nanoparticles

### History

 Received 5 December 2014  
 Revised 28 January 2015  
 Accepted 21 February 2015  
 Published online 23 March 2015

### Introduction

Nanotechnology is a rapidly growing field, with the application of engineered nanomaterials in daily life constantly increasing. According to the recent review issued by the European Commission (2013), nanomaterial is defined as “a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1–100 nm”. In scientific literature, engineered nanoparticles (NPs) are usually defined as particles with at least one dimension between 1 and 100 nm.

With the reduction in their size and concomitant increase in their specific surface area per unit mass, nanoparticles possess unique physical–chemical properties, which have led to these small objects becoming attractive and useful research and production units. However, the same characteristic making NPs so attractive for their exploitation in new products have led to concerns that NPs may pose a risk for

humans and the environment (Beer et al., 2012). Due to increasing production volumes of NPs and growing likelihood of occupational and environmental exposure to nanomaterials, the legislative bodies in both EU and USA have currently focused their activities on assessing health and environmental risks of nanotechnology. Therefore, an improved understanding of the potential risks associated with exposure to nanomaterials is necessary (Maynard et al., 2006).

Metallic nanoparticles are important objects of study in modern material science due to their chemical, physical and biologic properties (Schmid, 2004). Of special interest are noble metal nanoparticles of silver and gold (Ag–AuNPs; Jain et al., 2008). Due to their bactericidal properties, silver nanoparticles (AgNPs) are widely applied as antimicrobial agents in food supplements, materials for food packaging, coatings on medical devices, water disinfectants, air filters, electronic appliances, odor-resistant textile fabrics and cosmetic products, such as deodorants (Hagen et al., 2011; Rai et al., 2009). Gold nanoparticles (AuNPs) are also widely used in surface-functionalized form for imaging, drug-delivery, cancer diagnostics, thermotherapy, for water and air purification and in many consumer products such as cosmetics, toothpaste or food supplements (Barcikowski & Mafune, 2011; Granmayeh et al., 2011; Homberger & Simon, 2010; <http://www.nanotechproject.org>). Despite the

Address for correspondence: Ana Isabel Haza, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Tel: +34-91-394 37 47. Fax: +34-91-394 37 43. E-mail: hanaais@vet.ucm.es

increasing use of these NPs in commercial products, little is known about the toxicity and cellular responses of them, and therefore the potential impacts on human and environmental health. In regards to the human interaction with Ag–AuNPs, numerous different exposure routes exist: via the lung, skin, bloodstream and ingestion. However, it is assumed, that inhalation of these NPs is of primary concern for humans in an occupational setting (Gangwal et al., 2011; Uboldi et al., 2009).

Inhalation exposures are likely to occur with personal hygiene and cleaning products that are intended to be sprayed, because these products release Ag–AuNPs into the breathing zone of consumers. Lung is considered to be the least protected organ and the main portal entry of inhaled NPs that can gain access to the alveoli, the deepest part of the respiratory tract (Nel et al., 2006). Inhalation exposure studies suggested that inhaled particles might reach the brain through nasopharyngeal system (Oberdorster, 2004). However, despite the studies, there is limited information on *in vitro* toxicity of Ag–AuNPs in lung cells. Therefore, it is necessary to determine the adverse consequences for human health associated with pulmonary exposure to Ag–AuNPs.

The toxicity of nanomaterials is mainly due to oxidative stress (De Stefano et al., 2012). Ag–AuNPs were reported to act via reactive oxygen species (ROS) generation and glutathione depletion (Ávalos et al., 2014a; Hussain et al., 2005; Martínez Paino et al., 2012; Mateo et al., 2014a). The depletion of antioxidants including glutathione and protein bound sulfhydryl groups and the increase in activity of various anti-oxidant enzymes indicative of lipid peroxidation have been implicated in oxidative damage of cell molecules (Ahamed & Siddiqui, 2007).

For *in vitro* studies with NPs, the selection of cell types representing the target tissue is very important. In previous studies, we have used human hepatoma, leukemia cells and normal dermal fibroblasts to understand difference in the cellular response to Ag–AuNPs (Ávalos et al., 2014a,b; Mateo et al., 2014a,b). In this study, human pulmonary fibroblasts (HPF) have been used because it is relevant to consider the implications of inhalation exposure to Ag–AuNPs. Furthermore, it would be interesting and perhaps fruitful to evaluate the comparative toxicity of these nanoparticles in different cell cultures. Therefore, the main goal of this study was to study how different sizes of silver (4.7 and 42 nm) and gold nanoparticles (30, 50 and 90 nm) interact with human pulmonary fibroblasts in order to understand the impact of such nanomaterials on cellular biological functions. In addition, total glutathione content, activity of superoxide dismutase (SOD) and reactive oxygen species (ROS) generation were used to evaluate feasible mechanisms by which AgNPs and AuNPs exerted its toxicity.

## Materials and methods

### Chemicals

All chemicals were reagent grade or higher and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise specified. Water-based solutions of silver (4.7 and 42 nm) and gold nanoparticles (30, 50 and 90 nm) were purchased from Nanogap Subparticles (A Coruña, Spain) and

CymitQuímica (Barcelona, Spain), respectively. Stock solutions of Ag–AuNPs were diluted to the required concentrations using the respective cell culture medium. *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) was purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO).

### Cell culture

Human pulmonary fibroblasts (HPF) were purchased from commercial PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany). They were cultured as monolayer in Fibroblast Basal medium supplemented with 2% v/v fetal calf serum, 1 ng/mL basic fibroblast growth factor (recombinant human), 5 µg/mL insulin (recombinant human) and 1% v/v penicillin–streptomycin. Culture medium and supplements were purchased from PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany). The human cell culture was incubated at 37 °C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Nanoparticles characterization

The characterization of Ag–AuNPs to determine their primaries sizes, morphology, agglomeration and size distribution in aqueous solution and after incubation in cell-free culture media by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) was conducted in previous studies (Ávalos et al., 2014a,b; Mateo et al., 2014a,b).

### Cytotoxicity endpoints

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction and lactate dehydrogenase (LDH) leakage were used as parameters for cytotoxicity assessment.

### MTT assay

MTT is based on the mitochondrial reduction of tetrazolium salt (MTT) into an insoluble formazan product by succinic dehydrogenase. The assay was assessed according to the manufacturer's instructions (Cell Proliferation Kit I, Roche, Indianapolis, IN). Briefly, HPF ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were plated onto multiwell systems and incubated for 24 h. After seeding, 100 µL of different concentrations of AgNPs (0.84–2000 µg/mL) and AuNPs (1–25 µg/mL) or negative (without NPs) and positive controls (20 mM of *N*-nitrosodibutylamine, NDBA, 5% cell viability; García et al., 2008) were added to the wells and plates were incubated for 24, 48 and 72 h at 37 °C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In order to reduce agglomeration previously, the NPs suspensions were mixed using vortex for 20 s and sonicated for 30 min. The optical density (OD) of each well was read at 620 nm (test wavelength) and 690 nm (reference wavelength) by an ELISA with a built-in software package for data analysis (iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finland).

Values presented in this article are mean  $\pm$  standard deviation (SD). Results were expressed as the percentage of survival (% SDH) with respect to the control cells according to the following equation: % SDH activity =  $(A_1/A_0) \times 100$ , where  $A_1$  is the absorbance of the cells exposed to the Ag–AuNPs, and  $A_0$  is the absorbance of the negative control (cells without NPs). All NPs concentrations were tested in

Table 1. Calculated EC<sub>50</sub> values of Ag–AuNPs in HPF cells.

|     | EC <sub>50</sub> AgNPs (μg/mL) |       | EC <sub>50</sub> AuNPs (μg/mL) |       |       |
|-----|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|-------|
|     | 4.7 nm                         | 42 nm | 30 nm                          | 50 nm | 90 nm |
| MTT | 7.7                            | 1150  | 18                             | 19.8  | 20    |
| LDH | 6.8                            | 548.3 | 15.3                           | 17.8  | 18.9  |

The EC<sub>50</sub> values represent the effective concentration of Ag–AuNPs that decreases the amount of viable cells to 50% after 24 h as determined by MTT and LDH assays.

16 replicates and the experiments were repeated three independent times.

#### LDH assay

Membrane integrity was assessed by measuring extracellular LDH using a commercially available kit from Roche [cytotoxicity detection kit (LDH), Roche Diagnostic, Indianapolis, IN]. Cytosolic LDH is released into the culture medium if the integrity of the cell membrane deteriorates in cells suffering from irreversible cell death. Briefly, HPF were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/mL culture medium. After 24 h of seeding, 100 μL of different concentrations of AgNPs (0.84–2000 μg/mL) and AuNPs (1–25 μg/mL) or negative (without NPs) and positive controls were added to the wells and the plates were incubated for 24, 48 and 72 h at 37 °C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In order to reduce agglomeration previously, the NPs suspensions were mixed using vortex for 20 s and sonicated for 30 min. Cell-free culture media was collected from each well and incubated with a reaction mixture for 30 min. The plates were read with a microplate reader at 490 nm. A solution of 2% Triton X-100, which lead to 100% cytotoxicity through cell lysing and thus to maximum LDH leakage, was used as a positive control.

The percentage of LDH leakage was calculated as follows: LDH leakage (%) = (experimental value – untreated control) / (positive control – untreated control) × 100 and represent the mean of three independent experiments, each using 16 wells per concentration.

Using data from MTT and LDH assays, the effective concentration of Ag–AuNPs that decrease the amount of viable cells to 50% (EC<sub>50</sub>), was obtained (Table 1).

#### Effect of N-acetyl-L-cysteine in AgNPs induced cytotoxicity

N-Acetyl-L-cysteine (NAC) is a recognized radical scavenger and antioxidant (Zafarullah et al., 2003). The protective effect of NAC against NPs-induced cytotoxicity was evaluated using the MTT assay. NAC (20 mM) was added to HPF cells 1 h before the addition of Ag–AuNPs at EC<sub>50</sub> concentrations. Then, the procedure was similar to the MTT assay described above.

#### Intracellular reactive oxygen species measurement

Reactive oxygen species (ROS) production was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) from Molecules Probes (Eugene, OR). H<sub>2</sub>DCFDA diffuses through the cell membrane and is enzymatically hydrolyzed

by intracellular esterases to non-fluorescent dichlorofluorescein (DCFH). In the presence of ROS, this compound is rapidly oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF). For these experiments, HPF cells were seeded in 24-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL culture medium. After seeding, 1 mL of 24 h MTT EC<sub>50</sub> of the corresponding Ag–AuNPs or positive control (20 mM NDBA, 90% ROS production; García et al., 2008) were added to the wells and the plates were incubated for different time intervals (15 min–48 h). Then,  $2 \times 10^5$  cells were washed with PBS loaded for 30 min with H<sub>2</sub>DCFDA (10 μM) and incubated in a water bath (37 °C). Cells were kept on ice and fluorescence intensity was read immediately with a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson) and the CellQuest software (Centro de Microscopía y Citometría, UCM, Madrid, Spain). For each experiment, 10<sup>4</sup> cells were analyzed.

#### Total glutathione content

The total glutathione content was measured using a commercial colorimetric assay kit, OxiSelect Total Glutathione (GSSG/GSH; Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA). Glutathione reductase reduces oxidized glutathione (GSSG) to reduced GSH in the presence of NADPH. Subsequently, the chromogen reacts with the thiol group of GSH to produce a colored compound. The assay was assessed according to the manufacturer's instructions. Briefly, HPF cells were treated with 24 h MTT EC<sub>50</sub> of the corresponding Ag–AuNPs for 24, 48 and 72 h. After treatment, cells were centrifuged and washed with cold 1X PBS. The pellet was resuspended with 200–500 μL ice-cold 0.5% metaphosphoric acid (MPA), the cells were again centrifuged at 1200 rpm for 5 min at 4 °C and collected the supernatant. Then, 25 μL 1 × glutathione reductase and 25 μL 1 × NADPH were added in 96-well plate and after that 100 μL of the samples were added. Finally, 50 μL 1 × chromogen was added and mixed briefly. Immediately, the absorbance was recorded at 405 nm by an ELISA with a built-in software package for data analysis (iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finland) at 2 min intervals for 10 min.

The total glutathione content was determined by comparison with the pre-determined glutathione standard curve. Results were expressed as percentage of total glutathione (GSSG/GSH) content.

#### Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured using a commercial colorimetric assay kit, OxiSelect Superoxide Dismutase Activity (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA). Superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>•−</sup>) are generated by Xanthine/Xanthine oxidase (XOD) system and detected with a chromogen solution. However, in the presence of SOD, the superoxide anion concentration is reduced. Briefly, HPF cells were treated with 24 h MTT EC<sub>50</sub> of the corresponding Ag–AuNPs for 24, 48 and 72 h. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS and then were incubated on ice with 1 × Lysis Buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton-100) for 10 min. Later, cells were centrifuged at 12 000 × g for 10 min and the cell lysate supernatant was collected and added (10 μL) to 96-well plate and then 80 μL of the master mixture (containing xanthine solution,



chromogen, lysis buffer and water) was added. Finally, 10  $\mu$ L 1  $\times$  XOD solution was added and immediately the absorbance was read at 490 nm by an ELISA with a built-in software package for data analysis (iEMS Reader MF, LabSystems, Helsinki, Finland).

The results were expressed as percentage of SOD activity (% activity) and were calculated as follows: SOD activity =  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ , where  $A_0$  is the absorbance of the negative control and  $A_1$  is the absorbance of the cells exposed to the NPs.

#### Statistical analyses

All means were calculated from three independent experiments, and are expressed in the graphs as mean and standard deviation (SD). The Student's *t*-test was used for statistical comparison and differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ . Descriptive and graphical methods were used to characterize the data. All tests were performed with the software package Statgraphics Plus Version 5.0 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA).

### Results

#### Effect of Ag–AuNPs on cellular viability

In this study, we used two cytotoxicity markers, MTT and LDH leakage, for evaluating the effects of Ag–AuNPs on cellular viability. The results of the MTT viability assay showed a significant decrease in mitochondrial function of HPF cells exposed to AgNPs 4.7 nm (Figure 1A) at the concentrations of 6.72  $\mu$ g/mL AgNPs for 48 and 72 h (37% of survival) and 13.45  $\mu$ g/mL and all incubation times (15 and 6% of cell viability, respectively). In the LDH assay (Figure 1B), the treatment of 6.72  $\mu$ g/mL achieved a moderate increase of LDH at 24, 48 and 72 h (49, 69 and 70% of LDH released, respectively). However, the concentration of 13.45  $\mu$ g/mL presented the highest percentage of LDH leakage at all times of treatment (92, 96 and 97% of LDH released, respectively).

Figure 1(C) and (D) shows the cytotoxic effect of AgNPs of 42 nm on HPF cells. The results of the MTT assay showed that after 48 and 72 h of treatment with 500  $\mu$ g/mL the HPF cell viability decreases to 38 and 36% of survival, respectively, and even further, at concentrations of 2000  $\mu$ g/mL, the cell survival decreases to 26% at 24 h and to 5% at 48 and 72 h of treatment (Figure 1C). In parallel, results obtained by LDH assay showed that the percentage of LDH leakage presented a strong increase at concentrations of 500  $\mu$ g/mL (49, 63 and 64% of LDH leakage) and 2000  $\mu$ g/mL (87% at 24 h and 96% of LDH leakage at 48 and 72 h of treatment; Figure 1D).

The results of the MTT viability assay of AuNPs (30, 50 and 90 nm) are shown in Figure 2. The three AuNPs behaved in a very similar way. The HPF cells showed a percentage of cell survival greater than 65% after treatment with the three AuNPs at concentrations from 1 to 15  $\mu$ g/mL and all incubation times. However, the highest AuNPs dose assayed, 25  $\mu$ g/mL, drastically reduced cell viability at all times of incubation (19–8% of cell survival; Figure 2A–C). Similar results were obtained by LDH assay (Figure 2). A significant LDH leakage was determined after cells were treated with AuNPs of 30 and 50 nm at 15  $\mu$ g/mL for 48 and 72 h (58–67%

and 50–54% of LDH leakage, respectively; Figure 2D and E). The treatment with AuNPs 90 nm under the same conditions did not reach a 50% of LDH leakage (44–49% LDH leakage; Figure 2F). The highest LDH leakage was after 72 h of treatment with the AuNPs 30, 50 and 90 nm at 25  $\mu$ g/mL (92, 87 and 80% of LDH leakage, respectively; Figure 2D–F).

The EC<sub>50</sub> values calculated from a regression curve in terms of inhibition of cellular metabolic activity (MTT) and membrane stability (LDH) are shown in Table 1. These values represent the effective concentration of Ag–AuNPs that decrease the amount of viable cells to 50% after 24 h. Values of EC<sub>50</sub> obtained by MTT assay with AgNPs 4.7 and 42 nm (7.7 and 1150  $\mu$ g/mL, respectively) and AuNPs 30, 50 and 90 nm (18, 19.8 and 20  $\mu$ g/mL, respectively) were higher than those obtained by LDH with AgNPs 4.7 and 42 nm (6.8 and 548.3  $\mu$ g/mL, respectively) and AuNPs 30, 50 and 90 nm (15.3, 17.8 and 18.9  $\mu$ g/mL, respectively), which suggests that cell membrane integrity is more readily affected than the tested metabolic activities.

#### Protective effect of NAC

N-Acetyl-L-cysteine (NAC) is an important antioxidant and serves as a precursor for the synthesis of glutathione (Nel et al., 2006). Ag–AuNP-induced inhibition of MTT reduction was largely prevented by NAC (Figure 3). The viability of HPF cells pre-treated with 20 mM NAC prior to a 24 h treatment with the 24 h MTT EC<sub>50</sub> of AgNPs of 4.7 nm (7.66  $\mu$ g/mL) and AgNPs of 42 nm (1150  $\mu$ g/mL) increased to 100 and 78%, respectively (Figure 3A). AuNPs showed similar results (Figure 3B), the pre-treatment with 20 mM NAC after 24 h with MTT EC<sub>50</sub> of AuNPs 30 nm (18  $\mu$ g/mL), 50 nm (19.8  $\mu$ g/mL) and 90 nm (20  $\mu$ g/mL) increased the HPF viability to 74, 73.4 and 79%, respectively. Thus, our results suggest that oxidative stress is primarily responsible for the cytotoxicity of AgNPs.

#### Ag–AuNPs derived induction of ROS

To establish the role of oxidative stress as a decisive factor in Ag–AuNPs toxicity, ROS generation was measured. After treatment of HPF cells with Ag–AuNPs, DCF fluorescence was measured by flow cytometry and expressed as percentage of control. A significant increase of ROS levels was observed in HPF cells after treatment with 24 h MTT EC<sub>50</sub> of AgNPs 4.7 nm (7.66  $\mu$ g/mL) and 42 nm (1150  $\mu$ g/mL), reaching the maximum signal after 30 min and 24 h treatment, respectively. ROS levels increased 1.32-fold (AgNPs 4.7 nm) and 1.55-fold (AgNPs 42 nm) more than the control (Figure 4A). AuNPs showed much higher significant increase of ROS levels after treatment with MTT EC<sub>50</sub> of AuNPs 30 nm (18  $\mu$ g/mL), 50 nm (19.8  $\mu$ g/mL) and 90 nm (20  $\mu$ g/mL). The maximum signal for the three AuNPs was after 3 h treatment, in which the ROS levels were 4.20-fold (AuNPs 30 nm), 4.77-fold (AuNPs 50 nm) and 3.76-fold (AuNPs 90 nm) more than the control (Figure 4B).

#### Cellular antioxidant response

The action of intracellular molecular antioxidants (glutathione) and regulation of antioxidant enzymes activity, such as superoxide dismutase are shown in Figures 5 and 6.

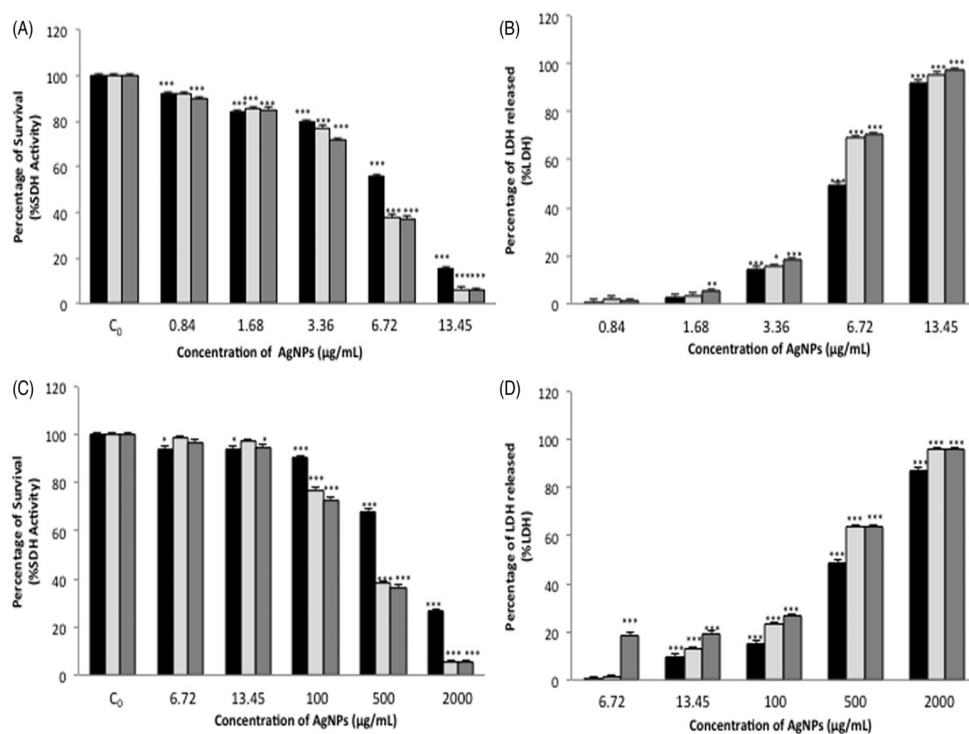


Figure 1. Effects of AgNPs 4.7 and 42 nm on HPF cell viability by MTT (A, C) and LDH (B, D) assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▒) h.  $C_0$  untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \* $p \leq 0.05$ .

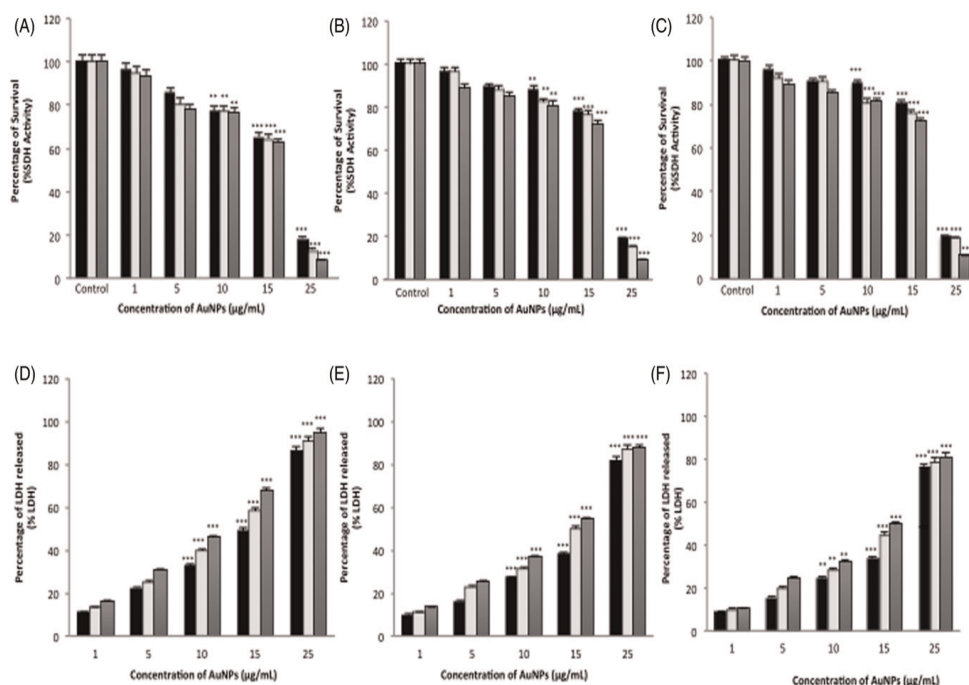


Figure 2. Effects of AuNPs 30, 50 and 90 nm on HPF cell viability by MTT (A, B, C) and LDH (D, E, F) assays. Cells were cultured with different doses of AuNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▒) h.  $C_0$  untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$  and \*\* $p \leq 0.01$ .



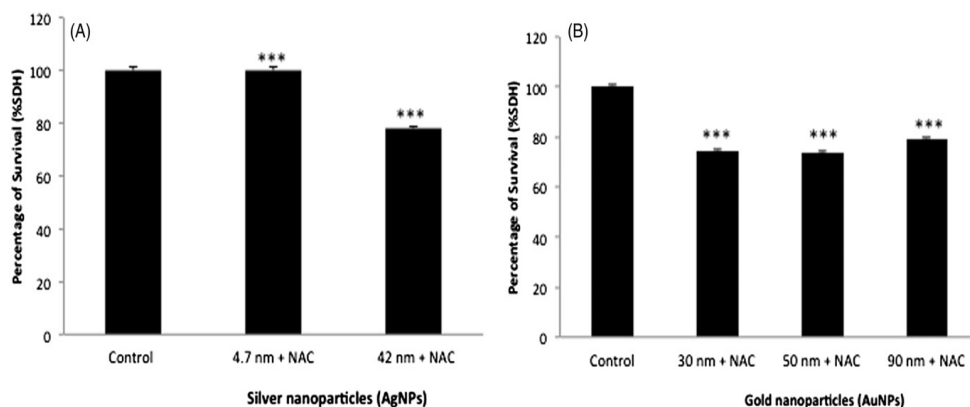


Figure 3. Protective effects of NAC against treatment with 24 h MTT  $EC_{50}$  doses of AgNPs of 4.7 and 42 nm (A) and AuNPs of 30, 50 and 90 nm (B) in HPF cell viability by MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 h. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$ .

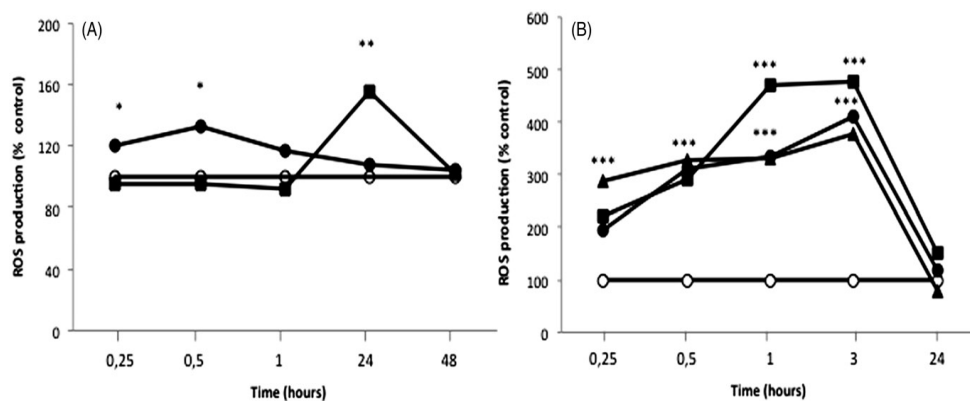


Figure 4. Time-course of ROS production in untreated HPF cells (○) and treated with 24 h MTT  $EC_{50}$  doses of AgNPs (A) of 4.7 nm (●) and 42 nm (■) and AuNPs (B) of 30 nm (●), 50 nm (■) and 90 nm (▲). Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \* $p \leq 0.05$ .

Our data demonstrated a significant depletion ( $p < 0.01$ ) of total glutathione content (GSSG/GSH) occurred in AgNPs (4.7 and 42 nm) and AuNPs (30, 50 and 90 nm) exposed cells. Total glutathione content (GSSG/GSH) in HPF cells exposed to the 24 h MTT  $EC_{50}$  of AgNPs 4.7 nm, reduced approximately to 7.5% relative to control, for 24 h, and 5% for 48 and 72 h (Figure 5A). The treatment with 24 h MTT  $EC_{50}$  of AgNPs 42 nm depleted GSSG + GSH to 33.3% (24 h) and 1% (48 and 72 h) relative to control (Figure 5A). AuNPs 30 nm showed similar results, the total glutathione content exposed to 24 h MTT  $EC_{50}$ , reduced to 36% (24 h) and 8–1% (48 and 72 h) relative to control (Figure 5B). The treatment with 24 h MTT  $EC_{50}$  of AuNPs 50 and 90 nm, depleted total glutathione content to 60 and 46% (24 h), respectively. The treatment with both AuNPs for 72 h decreased significantly the GSSG + GSH to 10% and 16%, respectively (Figure 5B).

The activity of antioxidant enzymes was also modulated (Figure 6). Superoxide dismutase activity was slightly reduced after HPF treatment with the 24 h MTT  $EC_{50}$  of AgNPs 4.7 and 42 nm for all incubations times (~80%), but this reduction was not statistically significant (Figure 6A).

The same happened with 24 h MTT  $EC_{50}$  of AuNPs 30, 50 and 90 nm, exhibited statistically insignificant changes in the SOD activity with respect to control group, independently on the incubation time and nanoparticle size (Figure 6B).

## Discussion

Although the beneficial effects of AgNPs and AuNPs have attracted considerable attention in terms of nanomedicine (Aliiev et al., 2009; Barreto et al., 2011; Chen & Schluesener, 2008), potential biological and environmental hazards should also be taken into account. In particular, because pulmonary exposure to NPs occurs during handling of NPs, it is necessary to evaluate the toxic response in pulmonary cells. Considering this fact, in this study, HPF cells were used as *in vitro* model of human lung epithelial cells to investigate and compare the potential mechanism of AgNPs and AuNPs of different size induced toxicity.

Previously to this work, our research group carried out the characterization of AgNPs and AuNPs in aqueous solution and in fibroblast culture medium (Ávalos et al., 2014a,b;

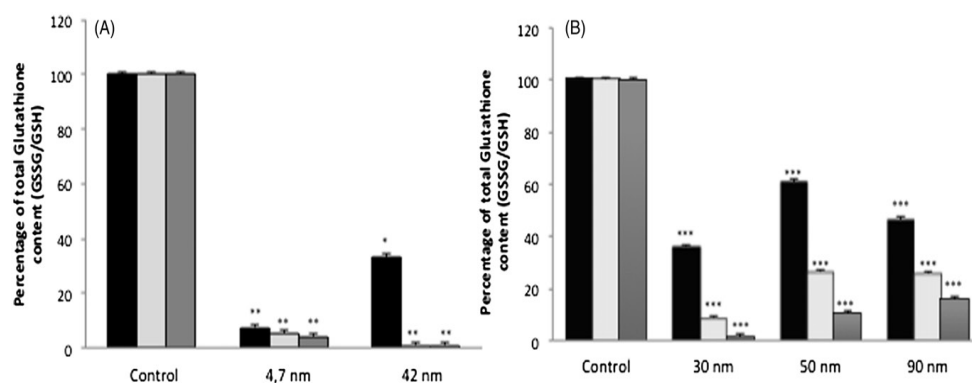


Figure 5. Effects of AgNPs of 4.7 and 42 nm (A) and AuNPs of 30, 50 and 90 nm (B) in the total glutathione content on HPF cells. Cells were cultured with 24 h MTT  $EC_{50}$  doses of Ag–AuNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▒) h. Control untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \* $p \leq 0.05$ .

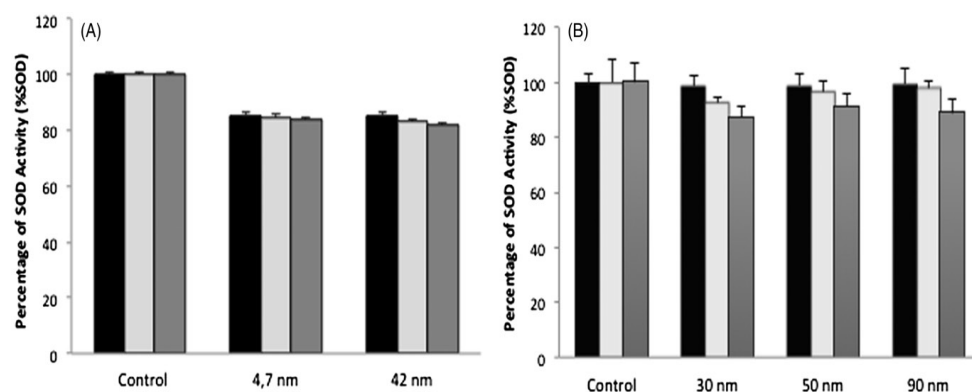


Figure 6. Effects of AgNPs 4.7 and 42 nm (A) and AuNPs 30, 50 and 90 nm (B) in the SOD activity on HPF cells. Cells were cultured with 24 h MTT  $EC_{50}$  doses of Ag–AuNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▒) h.

Mateo et al., 2014a,b). Size results in aqueous solution confirmed the data supplied by the manufacturer. These NPs increased their size, forming aggregates, when were incubated in culture medium (29 and 6 times larger with AgNPs 4.7 and 42 nm, respectively, and 2.35, 1.93 and 1.4 times larger with AuNPs 30, 50 and 90 nm, respectively). This happens because the nanoparticles are easily aggregated in a cell culture medium due to the high ionic nature of the solution and the electrostatic/van der Waals interaction between protein and nanoparticles (Horie et al., 2012). However, AgNPs showed larger agglomerates sizes than AuNPs, and this probably happens because AuNPs, consisting of a more inert metal than AgNPs, are not too sensitive to elevate ionic strengths.

Viability assays are vital steps in toxicology that explain the cellular response to a toxicant. The two assays used in this study (MTT and LDH) showed that both AgNPs (4.7 and 42 nm) contributed to a decrease in HPF viability (Figure 1). The toxic response of A549 lung cells exposed to AgNPs of 78 nm was studied by Foldbjerg et al. (2011) and it was found that AgNPs reduced cell viability in a significant manner after 24 h of treatment from 10 to 20  $\mu\text{g/mL}$ . The reduction of viability have been reported in almost all experiments performed on cultured cells, indicating that AgNPs potentially

affect the cell survival by disturbing the mitochondrial structure and metabolism (Asharani et al., 2009; Chairuangkitti et al., 2013). This does not happen with AuNPs, where there is a great controversy regarding their cytotoxicity, which may be due to the variability of parameters including cell lines used in toxicity assays, concentrations, surface charge and coatings. Thus, the results of the MTT and LDH assays showed that the exposure of HPF cells with the three different AuNPs sizes (30, 50 and 90 nm) produced a reduction in cell mitochondrial activity and LDH leakage (Figure 2). A study by Liu et al. (2014) also showed that AuNPs of 5 nm play a pivotal role in inhibiting the proliferation of two different lung cancer cell lines, A549 and 95D, after 48 and 72 h at 50  $\mu\text{g/mL}$ . However, other studies with AuNPs (10–50 nm) had not observed toxicity in embryonal fibroblasts or in the bronchial epithelial cell line BEAS-2B (Qu & Lü, 2009; Vetten et al., 2013).

The  $EC_{50}$  values show that the viability reduction was size-dependent in the case of AgNPs, being the smaller (4.7 nm) much more cytotoxic than large (42 nm; Table 1). Carlson et al. (2008) and Liu et al. (2010) also observed that smaller AgNPs were more cytotoxic than large ones. Recently, Wang et al. (2013) also showed that 20 nm citrate and PVP coated

AgNPs induced more cellular toxicity than larger particles (110 nm) and furthermore that the citrate coated 20 nm generated acute neutrophilic inflammation in the lungs of exposed mice to a much higher extent when compared to larger ones. However, with the AuNPs no consistent changes in the cytotoxicity were observed according to NP size (Table 1). Despite our results, Pan et al. (2007) demonstrated that after 48 h of treatment with AuNPs of 1 and 15 nm, smaller AuNPs had a wider distribution and higher toxic potential than larger ones. On the other hand, Mironava et al. (2010) described the interactions of 13 and 45 nm AuNPs with human dermal fibroblasts and found that larger nanoparticles were responsible of major cell damage.

Our previous (Ávalos et al., 2014a,b; Mateo et al., 2014a,b) and present results show, in agreement with Johnston et al. (2010) and Coulter et al. (2012), that the cytotoxicity of NPs, especially AgNPs, is different depending on the cell line. Moreover, the cell sensitivity to treatment with Ag–AuNPs is different with HPF cells being the most resistant to treatment with AgNPs, and HepG2 to AuNPs. These results suggest that the cell line is a crucial factor determining the cytotoxic response of the different NPs.

In order to investigate if oxidative stress was involved in Ag–AuNPs-induced cytotoxicity, the protective effect of antioxidant NAC and ROS production was studied. Our results showed that pre-treatment of HPF cell line with NAC caused a significant increase of cell viability against Ag–AuNPs cytotoxicity in HPF cells (Figure 3). Moreover, significant ROS generation observed in this study confirms that one of the primary mechanisms of Ag–AuNPs-induced cytotoxicity in HPF cells is oxidative stress (Figure 4). In agreement with Farkas et al. (2010), our results show that AuNPs caused higher formation of ROS than AgNPs. ROS production and oxidative stress are widely considered responsible of metallic NPs *in vitro* (Saqib et al., 2012; Yu et al., 2013) and *in vivo* (Girgis et al., 2012; Siddiqui et al., 2012) toxicity. ROS plays an important role in triggering many cellular pathways which can lead to cellular death, including cytokine activation (Brown et al., 2004) and caspase activation (Kim et al., 2009; Stennicke et al., 1998). They can also cause damage to the nuclear DNA by deoxyribosyl backbone (Cooke et al., 2003; Valko et al., 2004). Therefore, intracellular ROS generation upon Ag–AuNPs exposure is an important factor to its cytotoxicity.

The effects on total glutathione content and SOD activity were also monitored to make sure the role of oxidative stress as a mechanism of Ag–AuNPs induced toxicity. Total glutathione content was depleted in a significant way after treatment with both AgNPs and AuNPs (Figure 5), as formerly described in rat alveolar macrophages exposed to AuNPs (Tournebise et al., 2012), mouse fibroblasts exposed to titanium dioxide (Jin et al., 2008) and human lung carcinoma (A549) cells exposed to AgNPs (Chairuangkitti et al., 2013). However, in HPF cells treated with Ag–AuNPs at the EC<sub>50</sub>, no statistically significant changes in the activity of SOD were observed (Figure 6). These results suggest that a different and less pronounced response in HPF cells by this cellular defense mechanism as compared to GSH.

The physiochemical and structural properties of NPs affect their biological and toxicological effects (Xia et al., 2008).

In our study, AgNPs of 4.7 nm were much more cytotoxic than AgNPs of 42 nm and AuNPs. In contrast, ROS production was higher with the treatment of AuNPs, in particular with 50 nm. Moreover, the cytotoxicity of AgNPs was size-dependent, while the cytotoxicity of AuNPs was similar in all sizes studied (30, 50 and 90 nm). NPs of different chemical compositions and properties follow different uptake pathways and employ different mechanisms toward their final biological responses (Hsiao & Huang, 2011). Therefore, the route of cellular uptake as well as the material characteristics that lead to engagement of oxidative stress pathways determines the biological outcome. For this reason, scientists cannot determine the entire toxicity merely by studying a single type of NPs.

## Conclusions

In conclusion, our results indicate that the cellular metabolic activity and the membrane stability of HPF cells have been damaged after AgNPs and AuNPs exposure. In the case of AgNPs, this damage was in a size-dependant fashion, being the small AgNPs (4.7 nm) much more cytotoxic than large AgNPs (42 nm). In addition, the cytotoxicity induced by Ag–AuNPs was efficiently prevented by NAC treatment. This fact taken together with the depletion of total glutathione content and ROS production suggest that oxidative stress contributes to Ag–AuNPs-induced cytotoxicity. Hence, care has to be taken while processing and formulating the nanoparticles till its final finished product.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper. A. Ávalos is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). This work has been supported by Grant AGL2010-16561 from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain).

## References

- Ahamed M, Siddiqui MKJ. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin Chim Acta* 383:57–64.
- Aliev G, Daza J, Lipsitt A, et al. (2009). Silver nanoparticle as alternate strategies for drug delivery to Alzheimer brain. *Alzheimer Dement* 5:324.
- Asharani PV, Grace LKM, Hande MP, Aliyaveetil S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3:279–90.
- Ávalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. (2014a). Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *J Appl Toxicol* 34:413–23.
- Ávalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. (2014b). Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. *Int Wound J*. [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/iwj.12244.
- Barcikowski S, Mafune F. (2011). Trends and current topics in the field of laser ablation and nanoparticle generation in liquids. *J Phys Chem C* 115:4985.
- Barreto JA, O'Malley W, Kubeil M, et al. (2011). Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. *Adv Mater* 23:H18–40.
- Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, et al. (2012). Toxicity of silver nanoparticles – nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett* 208:286–92.
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, et al. (2004). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF – a cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:344–53.

DOI: 10.3109/15376516.2015.1025347

Effects of AgNPs and AuNPs in HPF cells 295

- Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, et al. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 112:13608–19.
- Chairuangkitti P, Somsong L, Sittiruk R, et al. (2013). Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol In Vitro* 27:330–8.
- Chen X, Schluesener HJ. (2008). Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett* 176:1–12.
- Cooke MC, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17:1195–214.
- Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, et al. (2012). Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int J Nanomed* 7:2673–85.
- De Stefano D, Carnuccio R, Maiuri MC. (2012). Nanomaterials toxicity and cell death modalities. *J Drug Deliv* 2012:167896.
- European Commission. (2013). Communication from the Commission to the European Parliament. The Council and the European Economic and Social Committee. Second regulatory review on nanomaterials. Brussels 3.10.2012. COM (2012) 572 final.
- Farkas J, Christian P, Urrea JA, et al. (2010). Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 96:44–52.
- Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol* 85:743–50.
- Gangwal S, Brown JS, Wang A, et al. (2011). Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential. *Environ Health Persp* 119:1539–46.
- García A, Morales P, Arranz N, et al. (2008). Induction of apoptosis and reactive oxygen species production by *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosodibutylamine in human leukemia cells. *J Appl Toxicol* 28: 455–65.
- Girgis E, Khalil WK, Emam AN, et al. (2012). Nanotoxicity of gold and gold-cobalt nanoalloy. *Chem Res Toxicol* 25:1086–98.
- Grammayeh Rad A, Abbasi H, Afzali MH. (2011). Gold nanoparticles: synthesising, characterizing and reviewing novel application in recent years. *Phys Procedia* 22:203–8.
- Hagen MS, Hansen E, Christensen TB, et al. (2011). Survey on basic knowledge about exposure and potential environmental and health risks for selected nanomaterials. Miljøprojekt 1-136. Environmental Project No. 1370 2011.
- Homberger M, Simon U. (2010). On the application potential of gold nanoparticles in nanoelectronics and biomedicine. *Phil Trans R Soc A* 368:1405–53.
- Horie M, Kato H, Fujita K, et al. (2012). In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem Res Toxicol* 25:605–19.
- Hsiao IL, Huang YJ. (2011). Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ* 409:1219–28.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, et al. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 19:975–83.
- Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. (2008). Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res* 41: 1578–86.
- Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. (2008). Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol* 21: 1871–7.
- Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, et al. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* 40:328–46.
- Kim S, Choi JE, Choi J, et al. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 23: 1076–84.
- Liu W, Wu Y, Wang C, et al. (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology* 4:319–30.
- Liu Z, Wu Y, Guo Z, et al. (2014). Effects of internalized gold nanoparticles with respect to cytotoxicity and invasion activity in lung cancer cells. *PLoS One* 9:e99175.
- Martinez Paino IM, Marangoni VS, et al. (2012). Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Lett* 215:119–25.
- Mateo D, Morales P, Ávalos A, Haza AI. (2014a). Oxidative stress contributes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Toxicol Mech Methods* 24:161–72.
- Mateo D, Morales P, Ávalos A, Haza AI. (2014b). Comparative cytotoxicity evaluation of different size gold nanoparticles in human dermal fibroblasts. *J Exp Nanosci*. [Epub ahead of print]. doi: 10.1080/17458080.2015.1014934.
- Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, et al. (2006). Safe handling in nanotechnology. *Nature* 444:267–9.
- Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, et al. (2010). Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4:120–37.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanoscale. *Science* 311:622–7.
- Oberdorster E. (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* 112:1058–62.
- Pan Y, Neuss S, Leifert A, et al. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3:1941–9.
- Qu Y, Lü X. (2009). Aqueous synthesis of gold nanoparticles and their cytotoxicity in human dermal fibroblasts-fetal. *Biomed Mater* 4: 025007.
- Rai M, Yadav A, Gade A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27:76–83.
- Saqib Q, Al-Khedhary AA, Siddiqui MA, et al. (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol In Vitro* 26:351–61.
- Schmid G (ed). (2004). Nanoparticles. From theory to application. Weinheim: Wiley-VCH.
- Siddiqui NJ, Abdelhalim MA, El-Ansary AK, et al. (2012). Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains. *J Neuroinflammation* 9:123–9.
- Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H, et al. (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 273:27084–90.
- Tournebise J, Boudier A, Joubert O, et al. (2012). Impact of gold nanoparticle coating on redox homeostasis. *Int J Pharm* 438:107–16.
- Uboldi C, Bonacchi D, Lorenzi G, et al. (2009). Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol* 6:18–30.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, et al. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266:37–56.
- Vetten MA, Tlotleng N, Rascher DT, et al. (2013). Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilized gold nanoparticles in three cell lines. *Part Fibre Toxicol* 10:50–65.
- Wang X, Ji Z, Chang CH, et al. (2013). Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. *Small* 27: 201301597.
- Xia T, Kovochich M, Liong M, et al. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2: 2121–34.
- Yu KN, Yoon TJ, Minai-Tehrani A. (2013). Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicol In Vitro* 27:1187–95.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60:6–20.



## Artículo V

---

**Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukaemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts.**

**Folia Biologica (Praha) (2015), 61: 33-42**







## Original Article

# Manufactured Silver Nanoparticles of Different Sizes Induced DNA Strand Breaks and Oxidative DNA Damage in Hepatoma and Leukaemia Cells and in Dermal and Pulmonary Fibroblasts

(comet assay / DNA strand breaks / genotoxicity / human cell lines / oxidative DNA damage / silver nanoparticles)

A. ÁVALOS, A. I. HAZA, P. MORALES

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain

**Abstract.** Many classes of silver nanoparticles (AgNPs) have been synthesized and widely applied, but no conclusive information on their potential cytotoxicity and genotoxicity mechanisms is available. Therefore, the purpose of this study was to compare the potential genotoxic effects (DNA strand breaks and oxidative DNA damage) of 4.7 nm coated and 42 nm uncoated AgNPs, using the comet assay, in four relevant human cell lines (hepatoma, leukaemia, and dermal and pulmonary fibroblasts) in order to understand the impact of such nanomaterials on cellular DNA. The results indicated that in all cell lines tested, 4.7 nm coated ( $0.1\text{--}1.6\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and 42 nm uncoated ( $0.1\text{--}6.7\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ) AgNPs increased DNA strand breaks in a dose- and size-dependent manner following 24 h treatment, the smaller AgNPs being more genotoxic. Human pulmonary fibroblasts showed the

highest sensitivity to the AgNPs. A modified comet assay using endonuclease III and formamidopyrimidine-DNA glycosylase restriction enzymes showed that in tumoral and normal human dermal fibroblasts, pyrimidines and purines were oxidatively damaged by both AgNPs, but the damage was not size-dependent. However, in human pulmonary fibroblasts, no oxidative damage was observed after treatment with 42 nm AgNPs. In conclusion, both AgNP sizes induced DNA damage in human cells, and this damage could be related to oxidative stress.

## Introduction

Nanoparticles (NPs), which are defined as particles having at least one dimension of 100 nm or less, are used to produce nanomaterials (Maynard and Kuempel, 2005). Materials at this scale typically exhibit nanostructure-dependent properties, such as unique physical properties (optical, electrical, and magnetic) and highly chemical reactivity, which make them more attractive for commercial and medical applications (Oberdörster et al., 2005). For example, these nanomaterials are used in bioapplications as therapeutics, transfection vectors and fluorescent labels (Tan et al., 2007; Yoon et al., 2007; Kreuter and Gelperina, 2008; Su et al., 2008). However, the novel physicochemical properties of nanoscale materials emphasize the need for proper assessment of their potential effects on human health. The main feature of these nanomaterials is that in comparison with bulk materials, NPs possess a higher surface-to-volume ratio and thus an enhanced contact area with their surroundings than do bulk materials at the same mass (Maurer-Jones et al., 2010). Their small size, high surface area per unit mass, chemical composition, and surface property effects may be important factors in NP-induced toxicity (Wallace et al., 2007) and nonspecific oxidative damage is one of the greatest concerns (Colvin, 2003; Nel et al., 2006; Xia et al., 2006).

Received July 23, 2014. Accepted November 13, 2014.

This work has been supported by Grant AGL2010-16561 from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). A. Ávalos is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain.

Corresponding author: Paloma Morales, Department of Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Faculty of Veterinary, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain. Phone: (+34) 91-394 37 47; Fax: (+34) 91-394 37 43; e-mail: pmorales@vet.ucm.es.

Abbreviations: AgNPs – silver nanoparticles, DLS – dynamic light scattering, Endo III – endonuclease III, Fpg – formamidopyrimidine-DNA glycosylase, HepG2 – hepatoma cells, HL-60 – leukaemia cells, HPF – human pulmonary fibroblasts, LDH – lactate dehydrogenase, MNF – micronucleation frequency, MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, NHDF – normal human dermal fibroblasts, NPs – nanoparticles, PEI – polyetherimide, PVP – polyvinylpyrrolidone, ROS – reactive oxygen species, SD – standard deviation, SOD – superoxide dismutase, TEM – transmission electron microscopy.

*Folia Biologica (Praha)* 61, 33–42 (2015)



Among the metallic nanomaterials, silver nanoparticles (AgNPs), owing to their anti-microbial potential, are the most commercialized NPs according to the Woodrow-Wilson database, which is a data source for information on products based on nanotechnology. AgNPs are currently exploited within a number of diverse products including electronics, cosmetics, household appliances, textiles and food production, as well as in medical products (Wijnhoven et al., 2009).

As a result of these applications, exposure to AgNPs is becoming increasingly widespread. Despite growing concerns, little is known about the potential impacts of AgNPs on human and environmental health.

For individuals, there are several possible ways to be exposed to AgNPs including dermal contact, oral administration, inhalation, intravenous injection, etc. (Chen and Schluesener, 2008; Ahamed et al., 2010; He et al., 2012). The human body has several semi-open interfaces for direct substance exchange with the environment, i.e. the respiratory tract, gastrointestinal tract and skin. At these sites, nanoparticle can undergo a series of processes such as binding and reacting with proteins, phagocytosis, deposition, clearance and translocation (Mukherjee et al., 2012). Thus, it is important to investigate the toxicity of AgNPs in relevant human tissues.

In this study we used the comet assay, because it is able to detect early DNA breakage with more sensitivity than conventional techniques such as 4',6-diamidino-2-phenylindole staining and DNA flow cytometry (Olive et al., 1993; Godard et al., 1999). It is also one of the most widely used tests and gives the most positive outcome for determining NP genotoxicity. In the present work, the comet assay was also modified to permit detection of oxidized bases by including a step in which DNA is digested with formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III) to uncover oxidized purines and pyrimidines, respectively. Thus, Fpg and Endo III enzymes were used to determine the role of oxidative DNA damage in AgNP genotoxicity. Fpg was selected for its ability to recognize imidazole-ring-opened purines, or formamidopyrimidines (fapy Ade and fapy Gua), which occur during the spontaneous breakdown of damaged purines; however, a major substrate in cellular DNA is 8-oxoGua (Boiteux, 1993). Endo III, acting as a glycosylase, recognizes a variety of oxidized pyrimidines in DNA and removes them, leaving an apurinic/apyrimidinic site (AP-site); and associated AP-endonuclease activity then creates a break in the DNA (Doetsch et al., 1987).

Despite all published studies, determination of the trend of silver nanoparticle toxicity (cytotoxicity and genotoxicity) may be considered complex owing to the different kinds of nanoparticle synthesis, their various sizes, the presence or absence of capping agents, and finally the diverse kinds of toxicity evaluation tests (Lima et al., 2012). Therefore, the European Commission (2012) has reported the necessity to perform determination of the risk of nanomaterials case by case.

The main goal of the present work was thus to compare the potential genotoxic effects (DNA strand breaks and oxidative DNA damage) of 4.7 nm coated AgNPs and 42 nm uncoated AgNPs, using the comet assay, in four relevant human cell lines (hepatoma, leukaemia, dermal and pulmonary fibroblasts) in order to understand the impact of such nanomaterials on cellular DNA.

## Material and Methods

### Chemicals

All chemicals were reagent grade or higher and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise specified. Water-based solutions of 4.7 nm PEI (polyetherimide) and PVP (polyvinylpyrrolidone) coated silver nanoparticles (AgNPs) and 42 nm uncoated AgNPs were purchased from Nanogap Subparticles (A Coruña, Spain). The summary of the characteristics according to the manufacturer's data is available in Table 1. Stock solutions of AgNPs were diluted to the required concentrations using the respective cell culture medium. In order to reduce agglomeration, the suspensions were mixed using a vortex for 20 s and sonicated for 2 × 20 s with a pause in between using a sonicator probe.

### Nanoparticle characterization

Characterization of AgNPs concerning their primary sizes, morphology, agglomeration and size distribution in aqueous solution, and after incubation in cell-free culture media by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS), was conducted in previous studies (Ávalos et al., 2014a, b).

### Cell culture

Tumoral human leukaemia cells (HL-60) and human hepatoma cells (HepG2) were obtained from the Biology Investigation Centre Collection (BIC, Madrid, Spain). HL-60 cells were maintained in RPMI 1640 medium and HepG2 cells were cultured as a monolayer in

Table 1. Characteristics of AgNPs obtained from NanoGap. Nd – no information provided

| Code   | Particles | Avg* ± SD (nm) | Dispersion solution               | Density (g/ml) | Density of particles (part/l) | Colour                       | pH  |
|--------|-----------|----------------|-----------------------------------|----------------|-------------------------------|------------------------------|-----|
| 2106-W | AgNP 4.7  | 4.7 ± 1        | Aqueous solution with PEI and PVP | 1.024          | 1.75 × 10 <sup>19</sup>       | Black, yellow (when diluted) | 9.3 |
| 2103-W | AgNP 42   | 42 ± 9         | Aqueous solution                  | 1.01           | Nd                            | Brown                        | Nd  |

\* As provided by the company, PEI – polyetherimide, PVP – polyvinylpyrrolidone

Dulbecco's modified Eagle's medium. The media were supplemented with 10% v/v heat-inactivated foetal calf serum, 50 µg/ml streptomycin, 50 UI/ml penicillin and 1% v/v L-glutamine. Culture medium and supplements required for the growth of the human tumoral cell lines were purchased from GIBCO (Laboratories Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD).

Normal human dermal fibroblasts (NHDF) and human pulmonary fibroblasts (HPF) were purchased from commercial PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany). NHDF and HPF were cultured as a monolayer in fibroblast basal medium supplemented with 2% v/v foetal calf serum, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor and 5 µg/ml insulin. Culture medium and supplements were purchased from PromoCell GmbH.

All human cell cultures were incubated at 37 °C and 100% humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

#### *Analysis of DNA strand breaks induced by AgNPs by alkaline comet assay*

The comet assay is based on the microscopic detection of damaged DNA fragments of individual cells, appearing as "comets" upon cell lysis, subsequent DNA denaturation and electrophoresis. To evaluate the DNA damage by AgNPs in tumoral and non-tumoral cells, we performed the comet assay as described by Olive et al. (1992). Previously, in our laboratory, cell viability after exposure to AgNPs 4.7 and 42 nm was routinely determined by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and LDH (lactate dehydrogenase) assays in HepG2, HL-60, NHDF and HPF in order to select non-toxic concentrations. The AgNPs of 4.7 nm and 42 nm showed to be cytotoxic in concentrations higher than 1.68 and 6.7 µg ml<sup>-1</sup>, respectively (Ávalos et al., 2014a, b). For this reason, the concentration ranges of 0.1–1.6 µg ml<sup>-1</sup> (AgNPs 4.7 nm) and 0.1–6.7 µg ml<sup>-1</sup> (AgNPs 42 nm) were used in genotoxicity studies. Briefly, HepG2, NHDF and HPF cells were plated in multi-well systems at a density of  $1.5 \times 10^5$  cell ml<sup>-1</sup> culture medium; 24 h after seeding, different concentrations of AgNPs of 4.7 (0.1–1.6 µg ml<sup>-1</sup>) and 42 nm (0.1–6.7 µg ml<sup>-1</sup>) were added to the wells and the plates were incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, 10 µl of a suspension of  $1.5 \times 10^5$  cells was mixed with 70 µl of LPM agarose type VII (0.75% concentration in PBS) distributed on slides that had been pre-coated with LMP agarose type VII (0.30% concentration in PBS), and left to set on an ice tray. Three slides were prepared for each concentration of the AgNPs tested.

After solidification, the cells were lysed in the dark for 1 h in a high-salt alkaline buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris, 1% Triton X-100, pH 10). The slides were then equilibrated 3 × 5 min in enzyme buffer (0.04 M HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg ml<sup>-1</sup> BSA, pH 8). After that, the slides were placed in electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13, cooled in a refrigerator) in the dark for 40 min. Electrophoresis was performed in a cold-storage room in the dark, in a Bio-Rad subcell GT unit containing the same buffer, for 30 min at 25 V. After electrophoresis, the slides were neutralized using 0.4 M Tris pH 7.5 and fixed in methanol. Subsequently, the DNA was stained with ethidium bromide (10 µg ml<sup>-1</sup>) in Tris-acetate EDTA (TAE IX) for 5 min and examined in a fluorescence microscope (Axiostar plus microscope, Zeiss, NY, NY) connected to a computerized image analysis system (Comet Score, 1.0). Percent (%) DNA in the tail, defined as the fraction of DNA in the tail divided by the total amount of DNA associated with a cell multiplied by 100, was used as the parameter for DNA damage analysis using the software. In experiments with HL-60 cells, the plates were incubated with  $1 \times 10^6$  cells in complete culture medium, and 500 µl of each of the different concentrations of AgNPs was added to each well. The plates were then incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and processed as described above. Benzo(a)pyrene (100 mM) was used as positive control.

rotophoresis was performed in a cold-storage room in the dark, in a Bio-Rad subcell GT unit containing the same buffer, for 30 min at 25 V. After electrophoresis, the slides were neutralized using 0.4 M Tris pH 7.5 and fixed in methanol. Subsequently, the DNA was stained with ethidium bromide (10 µg ml<sup>-1</sup>) in Tris-acetate EDTA (TAE IX) for 5 min and examined in a fluorescence microscope (Axiostar plus microscope, Zeiss, NY, NY) connected to a computerized image analysis system (Comet Score, 1.0). Percent (%) DNA in the tail, defined as the fraction of DNA in the tail divided by the total amount of DNA associated with a cell multiplied by 100, was used as the parameter for DNA damage analysis using the software. In experiments with HL-60 cells, the plates were incubated with  $1 \times 10^6$  cells in complete culture medium, and 500 µl of each of the different concentrations of AgNPs was added to each well. The plates were then incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and processed as described above. Benzo(a)pyrene (100 mM) was used as positive control.

#### *Analysis of oxidative DNA damage induced by AgNPs by modified comet assay*

Oxidatively damaged bases can also be detected with the comet assay by adding another step: after lysis, the DNA is digested with Fpg or Endo III to uncover oxidized purines and pyrimidines. The slides were incubated with 30 µl of Fpg and Endo III at 1 µg ml<sup>-1</sup> in enzyme buffer for 30 min at 37 °C in a humid dark chamber. Control slides were incubated with 30 µl enzyme buffer only. DNA treated with Endo III nicks the DNA at sites of oxidized pyrimidines, and Fpg recognizes, e.g., 8-oxodG and FAPydg, thereby increasing the number of DNA breaks (Collins et al., 1993). Then, the assay continued as described above. The levels of Fpg and Endo III sites were obtained by subtracting the value of % DNA in the tail obtained without added enzymes from the value when the enzymes were present. Benzo(a)pyrene (100 mM) incubated with Endo III and Fpg enzymes was also used as positive control.

#### *Statistical analyses of data*

Images of 50 randomly selected cells per concentration were evaluated and the test was carried out three times. The reported % DNA in the tail is the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. Cultures without AgNPs were considered as negative controls and cultures with benzo(a)pyrene as positive controls. Student's *t*-test was used for statistical comparison and differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

## Results

### *DNA strand breaks by AgNPs*

The alkaline comet assay was used to determine the DNA damage associated with exposure to non-cytotoxic

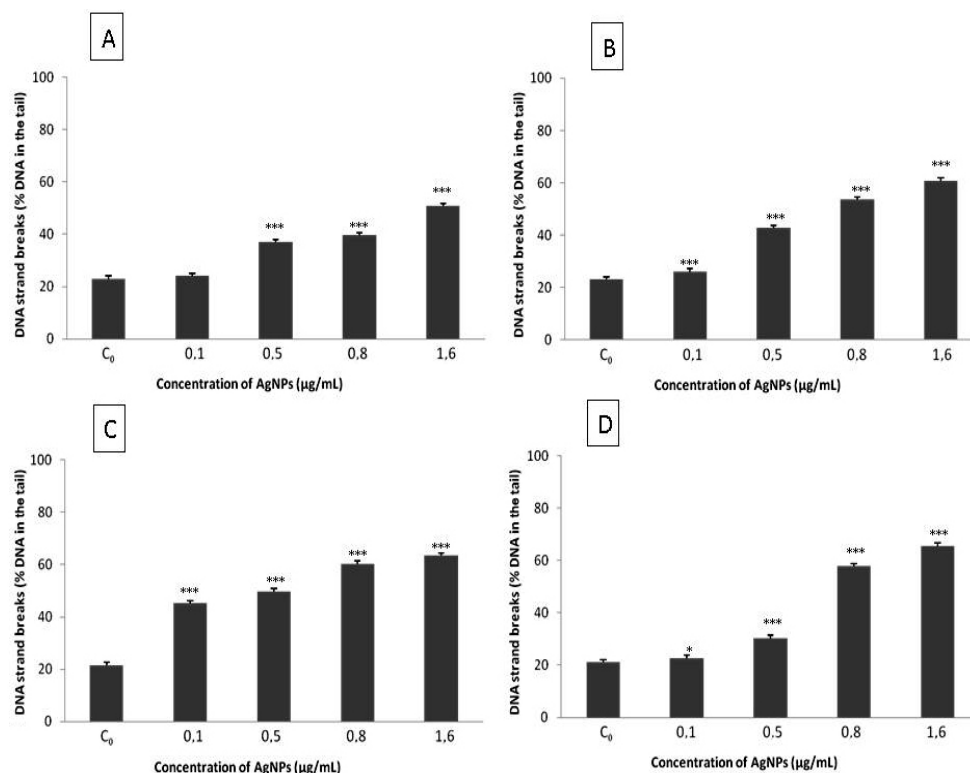


Fig. 1. DNA strand breaks in HepG2 (A), HL-60 (B), NHDF (C) and HPF (D) cells exposed to AgNPs of 4.7 nm, as determined by comet assay. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments for data point of the % DNA in the tail of cells. C<sub>0</sub> – untreated cells without enzymes.

Asterisks indicate significant difference from the control \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*  $P \leq 0.05$ .

concentrations of 4.7 nm coated AgNPs (0.1–1.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and 42 nm uncoated AgNPs (0.1–6.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells. A significant and dose-dependent increase in DNA migration was detected after 24 h of exposure in all cell types. The percentage of DNA in the tail was higher than control at all concentrations.

In HepG2 cells, 4.7 nm coated AgNPs induced a statistically significant increase in DNA strand breaks at concentrations of 0.5–1.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (37.1–50.8% tail) (Fig. 1A). In all the other cell lines, HL-60, NHDF and HPF, 4.7 nm coated AgNPs were also able to increase the percentage of DNA in the tail significantly at all tested doses, from 0.1–1.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (26.2–60.8% tail, Fig. 1B; 45.2–63.5% tail, Fig. 1C and 22.7–65.6% tail, Fig. 1D, respectively).

Figure 2 shows DNA damage induced by 42 nm uncoated AgNPs in HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells. HepG2 cells were the most resistant to the treatment of AgNPs of 42 nm; a significant increase of DNA strand breaks was only observed at concentrations of 1.6 and 6.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (40.1% and 61.4% tail, respectively) (Fig. 2A). However, HL-60 cells were the most sensitive, since increased DNA amount was observed in the tail at all concentrations tested, from 0.1–6.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (26.2–65.4% tail) (Fig. 2B). Finally, NHDF and HPF cells

showed significant DNA damage from 0.5–6.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (39.7–64.7% and 25.7–67.8% tail, respectively) (Fig. 2C, D).

Comparing DNA damage induced by both AgNP sizes at the same concentration (1.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), small coated AgNPs were more genotoxic than the large uncoated ones in all cell lines. In HepG2 cells, small coated AgNPs induced 50.8 % DNA in the tail, whereas the large uncoated ones only 40.1 %. The percentage of DNA in the tail induced by 4.7 nm AgNPs and 42 nm in HL-60 cells was 60.8 and 44.6 %, respectively. Finally, in NHDF and HPF, 4.7 nm AgNPs induced 63.5 % and 65.6 % DNA in the tail, respectively, whereas the large AgNPs only 45.5 % and a 55 % DNA.

The results of benzo(a)pyrene (100 mM) induced DNA strand breaks were  $\sim 2.24$  (HepG2), 2.87 (HL-60), 2.44 (NHDF) and 3.18 (HPF) fold higher than the background values (data not shown).

#### Oxidative DNA damage by AgNPs

In order to identify the oxidative DNA damage induced by 4.7 and 42 nm AgNP treatment, two repair-specific enzymes (Fpg and Endo III) that recognize and cut oxidized DNA bases were employed. In HepG2 cells (Fig. 3), the treatment with 4.7 nm coated AgNPs at all tested doses did not cause any significant increase of

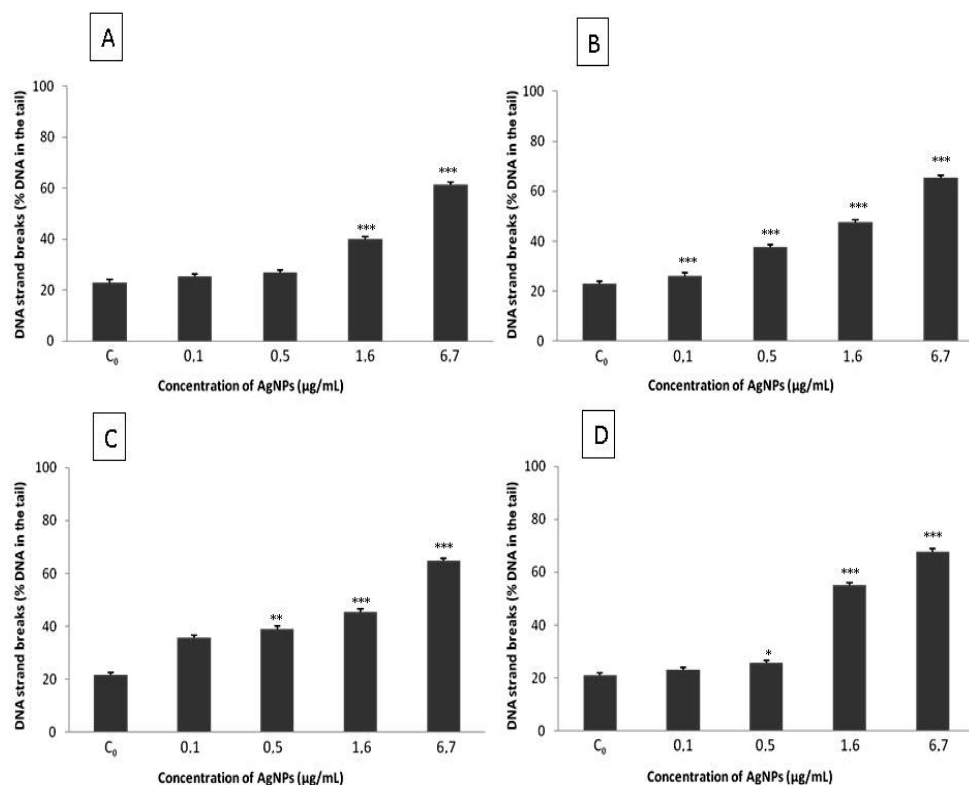


Fig. 2. DNA strand breaks in HepG2 (A), HL-60 (B), NHDF (C) and HPF (D) cells exposed to AgNPs of 42 nm, as determined by comet assay. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments for data point of the % DNA in the tail of cells. C<sub>0</sub> – untreated cells without enzymes.

Asterisks indicate significant difference from the control \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*  $P \leq 0.05$ .

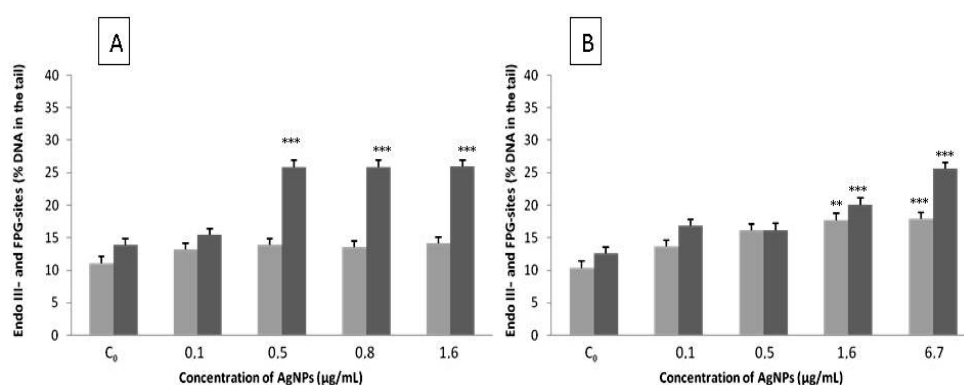


Fig. 3. Oxidative DNA damage, Endo III-sites (■) and Fpg-sites (■) in HepG2 cells exposed to AgNPs of 4.7 nm (A) and 42 nm (B), using the enzyme-modified comet assay. C<sub>0</sub> – untreated cells incubated with Endo III (■) and Fpg (■) enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*  $P \leq 0.01$ .

oxidized pyrimidines compared to the control. However, a significant increase of oxidized purines was observed after the treatment with 0.5–1.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AgNPs (12% increase of DNA in the tail compared to control) (Fig. 3A). In the treatment with 42 nm AgNPs, the concentrations of 1.6 and 6.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  caused a significant increase of Endo III- and Fpg-sites compared to the control (7.5%

and 7.5–13% increase of DNA in the tail compared to control, respectively) (Fig. 3B).

Oxidative DNA damage induced by 4.7 nm coated and 42 nm uncoated AgNPs in HL-60 cells incubated with Endo III and Fpg enzymes is shown in Fig. 4. A significant increase of oxidized pyrimidines (9.4% increase in DNA in the tail compared to control) was only

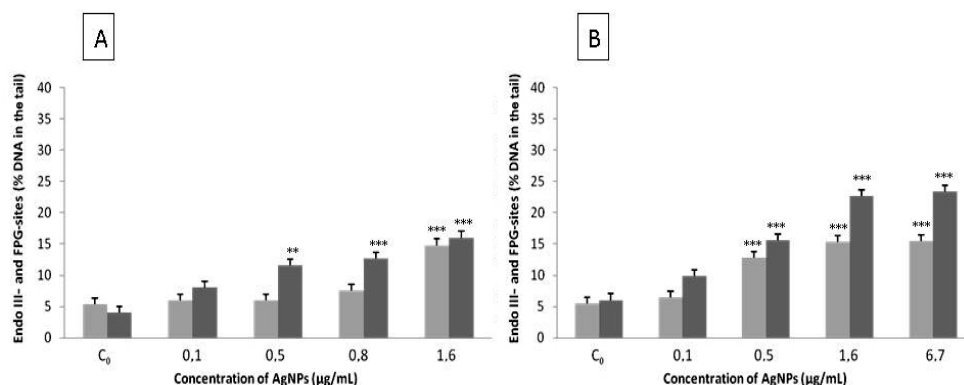


Fig. 4. Oxidative DNA damage, Endo III-sites (■) and Fpg-sites (■) in HL-60 cells exposed to AgNPs of 4.7 nm (A) and 42 nm (B), using the enzyme-modified comet assay. C<sub>0</sub> – untreated cells incubated with Endo III (■) and Fpg (■) enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control \*\*\* P ≤ 0.001, \*\* P ≤ 0.01.

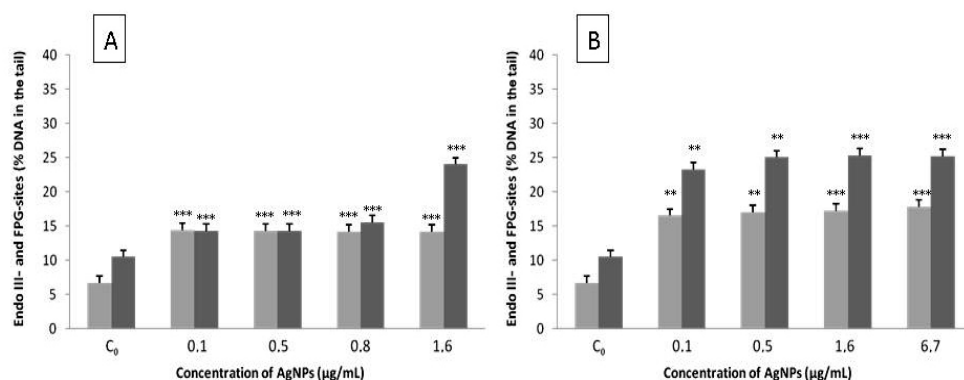


Fig. 5. Oxidative DNA damage, Endo III-sites (■) and Fpg-sites (■) in NHDF cells exposed to AgNPs of 4.7 nm (A) and 42 nm (B), using the enzyme-modified comet assay. C<sub>0</sub> – untreated cells incubated with Endo III (■) and Fpg (■) enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control \*\*\* P ≤ 0.001, \*\* P ≤ 0.01.

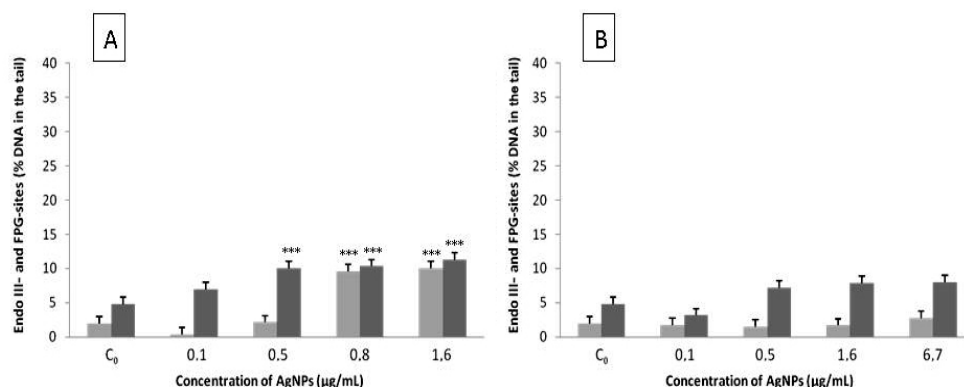


Fig. 6. Oxidative DNA damage, Endo III-sites (■) and Fpg-sites (■) in HPF cells exposed to AgNPs of 4.7 nm (A) and 42 nm (B), using the enzyme-modified comet assay. C<sub>0</sub> – untreated cells incubated with Endo III (■) and Fpg (■) enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control \*\*\* P ≤ 0.001.

observed at the highest concentration of 4.7 nm coated AgNPs, while oxidized purines were found at 0.5–1.6 µg ml<sup>-1</sup> (7.6–12 % increase in DNA in the tail compared to control, respectively)(Fig. 4A). With 42 nm uncoated AgNPs, a significant increase of Endo III- and Fpg-sites

was found at concentrations of 0.5–6.7 µg ml<sup>-1</sup> (7.3–10 % and 9.5–17.3 % increase in DNA in the tail compared to control, respectively)(Fig. 4B).

Figure 5 shows the oxidative DNA damage, Endo III- and Fpg-sites, in NHDF cells exposed to 4.7 nm and 42 nm



uncoated AgNPs. Coated AgNPs of 4.7 nm (Fig. 5A) significantly increased the number of Endo III-sites compared to the control at all tested doses ( $0.1\text{--}1.6\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ; 7.5% increase in DNA in the tail compared to control). Oxidized purines were also observed at all concentrations, but the maximum formation of Fpg sites was found at  $1.6\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  (13.5% increase in DNA in the tail compared to control). The large 42 nm uncoated AgNPs (Fig. 5B) induced oxidation of pyrimidines and purines at all tested doses (9.5% and 14.5% increase in DNA in the tail compared to control, respectively).

Finally, in HPF cells the treatment with 4.7 nm coated AgNPs (Fig. 6A) showed a significant increase in formation of Endo III-sites at  $0.8\text{--}1.6\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  (7% increase in DNA in the tail compared to control). However, the formation of Fpg-sites was found at concentrations of  $0.5\text{--}1.6\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  (5.2–6.5% increase in DNA in the tail compared to control, respectively). Uncoated AgNPs of 42 nm did not show any oxidative DNA damage. No significant increase in the formation of Endo III- and Fpg-sites (Fig. 6B) was found.

Benzo(a)pyrene (100 mM) used as positive control induced numbers of Endo III- and Fpg-sites 1.77–1.75 (HepG2), 2.30–2.38 (HL-60), 2.00–1.53 (NHDF) and 3.23–2.93 (HPF) fold higher than the background values, respectively (data not shown).

## Discussion

AgNPs, which have antibacterial properties, have been integrated into hundreds of consumer products. Consequently, industry workers, consumers and environment are anticipated to be increasingly exposed to AgNPs. The potential routes of human exposure are by oral administration, intravenous injection, dermal contact and inhalation; for this reason, HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells were used in the present study. Hepatoma cells (HepG2) were used because the liver is a primary site of AgNP accumulation following exposure (Johnston et al., 2010); leukaemia cells (HL-60) were used to investigate the effect of AgNPs on blood cells; dermal fibroblasts (NHDF) and pulmonary fibroblasts (HPF) were employed to consider the implication of dermal exposure to AgNPs (due to the exploitation of these particles within wound dressings) and to evaluate the pulmonary genotoxicity of AgNPs often focused on the response of epithelial cells that line the airways or alveoli (due to their prominent role in the particle clearance, Johnston et al., 2010).

Many studies in the area of nanotoxicology have focused on cytotoxicity. However, such effects often occur first at rather high concentrations, and the subtle effects that arise at lower concentrations, without necessarily causing cell death, also need to be considered. Previous studies have demonstrated that the mechanism of AgNP toxicity involves disruption of the mitochondrial respiratory chain, leading to production of reactive oxygen species (ROS) and interruption of ATP synthesis, which in turn causes DNA damage (Arora et al., 2008; Fold-

berg, 2009). One of the most important effects is damage to DNA, since an increased genetic instability is associated with cancer development (Karlsson, 2010). Genotoxicity evaluation is an ideal assessment of biosafety at the molecular level for nanomaterials. There are no standardized testing methods for the genotoxicity of nanoparticles; however, the comet assay is a highly sensitive method and widely applied in nanotoxicological studies about genotoxicity (Karlsson, 2010). In the review by Landsiedel et al. (2009), the comet assay was more sensitive and frequently used to confirm the genotoxicity of nanoparticles than the well-known Ames test in bacterial systems. Moreover, recent reviews have concluded that genotoxicity of nanomaterials is still inadequate for general conclusions (Cunningham, 2007; Landsiedel et al., 2009). In the present work, we conducted the comet assay to evaluate the genotoxicity of AgNPs of 4.7 nm and 42 nm in HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells.

Prior to the genotoxicity studies, our research reported nanoparticle characterization and cytotoxicity of AgNPs of 4.7 and 42 nm in HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells (Ávalos et al., 2014a, b). Our results showed that the particle size agrees well with the particle size in different AgNPs specified by the manufacture. AgNPs formed agglomerates in the cell medium, which were larger than the primary particle sizes. In addition, AgNPs of 4.7 nm and 42 nm exhibited a dramatic difference in cytotoxicity. Small AgNPs were much more cytotoxic than the large ones in all the cell types used. However, no cytotoxicity was previously found at the concentrations of AgNPs tested in the present work. Cell viability was always above 80 % of control viability.

In the present work, we used exposure to non-cytotoxic concentrations in the range of  $0.1\text{--}1.6\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  (AgNPs 4.7 nm) and  $0.1\text{--}6.7\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  (AgNPs 42 nm), based on previous studies of AgNPs against these human cells (Ávalos et al., 2014a, b). The results obtained in the comet assay indicated that both sizes of AgNPs were able to cause a significant and dose-dependent increase in DNA damage (strand breaks) after 24 h of treatment in HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells. Our data are in agreement with several *in vitro* studies using different sizes of AgNPs (5–260 nm) that have indicated genotoxicity effects in different types of human and mammalian cells (Ahamed et al., 2008; AshaRani et al., 2009; Kawata et al., 2009; Foldberg et al., 2011; Hackenberg et al., 2011; Kim et al., 2011; Flower et al., 2012; Li et al., 2012; Nymark et al., 2013). The most common effects considered in these studies include: DNA strand breaks, micronuclei induction and chromosomal aberrations, but not oxidative DNA damage. In the present study, the difference in the cellular response to AgNPs was also compared. Our results showed that DNA damage was similar in all cell lines, although HepG2 cells were the most resistant to DNA strand breaks after the treatment with 4.7 nm coated and 42 nm uncoated AgNPs (2.22 and 2.65-fold higher than control, respectively). Kawata et al. (2009) demonstrated

that exposure to  $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$  of AgNPs (7–10 nm in size) induced micronucleation frequency (MNF) up to 47.9 % in HepG2 cells. In our study, HPF cells showed the greatest proportion of DNA strand breaks compared to the control after the treatment with 4.7 nm coated and 42 nm uncoated AgNPs (3.09 and 3.24-fold, respectively) (Figs. 1D, 2D). In a study by Nymark et al. (2013), the genotoxic effects of AgNPs (42.5 nm) coated with PVP were investigated in a human bronchial epithelial cell line. DNA damage detected by the comet assay was seen after 4 and 24 h exposures and the induction was also dose-dependent. Accordingly, Kim et al. (2011) found that AgNPs (43–260 nm) stimulated DNA breakage and micronuclei formation in a dose-dependent manner in BEAS-2B cells. In another study, the comet assay test showed DNA damage in human mesenchymal stem cells after 1, 3 and 24 h at AgNP ( $< 50$  nm) concentrations from  $0.1$ – $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  (Hackenberg et al., 2011).

Our previous studies have also reported membrane leakage (LDH) and inhibition of mitochondrial activity (MTT) upon 4.7 and 42 nm AgNP exposure in different cell lines (HepG2, HL-60, NHDF and HPF) (Ávalos et al., 2014a,b). In all toxicity endpoints studied, 4.7 nm AgNPs were much more toxic than the large ones (42 nm). The particle size has been reported to influence toxicity (Cha et al., 2008; Hsin et al., 2008). In this work, the DNA strand breaks were also size-dependent, since 4.7 nm coated AgNPs ( $1.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) showed higher percentage of DNA in the tail than 42 nm uncoated AgNPs. In accord with our data, Park et al. (2011) also observed that AgNPs of 20 nm were more genotoxic than AgNPs of 80 nm and 113 nm in embryonic fibroblasts (MEF-LacZ). However, Gliga et al. (2014) demonstrated, using the comet assay, that in contrast to the size-dependent effect on lung cell viability, all tested AgNPs (10, 40 and 75 nm) induced similar DNA damage after 24 h.

In the present work, in addition to assessing the damage to DNA (strand breaks), we also evaluated the oxidative DNA damage induced by AgNPs (4.7 nm coated and 42 nm uncoated) in HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells. To this end, oxidatively damaged bases were detected by the comet assay by adding two repair-specific enzymes, endonuclease III and Fpg, which are able to recognize the oxidized pyrimidines and purines, respectively. Our results showed that AgNPs of 4.7 nm induced a significant increase of oxidation of pyrimidines (except in HepG2) and purines compared to the control in all cell lines (Figs. 3A, 4A, 5A and 6A). Moreover, AgNPs of 42 nm also significantly increased oxidation of the pyrimidines and purines compared to the control in HepG2, HL-60 and NHDF cells (Figs. 3B, 4B and 5B). However, 42 nm uncoated AgNPs did not cause any oxidative DNA damage in any of the concentrations used in HPF cells (Fig. 6B). Kim et al. (2011) observed that AgNPs (43–260 nm) induced oxidation of DNA bases in human normal bronchial epithelial cells. In another study with AgNPs of 5 nm, Mei et al. (2012) observed oxidation of pyrimidines and purines in mouse lymphoma cells by the oxidative stress comet assay.

Our results showed that the oxidative DNA damage by AgNPs was not size-dependent, but depended on the cell line. NHDF and HL-60 cells were the most sensitive to oxidized purines and pyrimidines induced by both AgNP sizes. However, HPF was the most resistant to the oxidative DNA damage induced by 42 nm AgNPs and HepG2 to the oxidized pyrimidines induced by 4.7 nm AgNPs. Different cellular responses related to oxidative DNA damage could be due to the diverse genetic background of human cells (Foldbjerg and Autrup, 2013).

Furthermore, our results showed that in all treatments purines were more oxidized than pyrimidines. This result is consistent with the reports that purines are more vulnerable targets to oxidative DNA damage than pyrimidines, because the pyrimidines can be rapidly repaired by transferring an electron to their purine counterpart (Jovanovic et al., 1986). The induction of DNA breaks by addition of Endo III and Fpg indicates that the DNA damage resulting from AgNP treatments mainly consisted in oxidized nucleotides.

Panda et al. (2011) observed that the DNA damage induced by AgNPs was prevented by Tiron and dimethyl thiourea that scavenge  $\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectively. ROS scavengers, especially superoxide dismutase (SOD), could reduce the genotoxic effects, thereby implicating oxidative stress as a mechanism (Kim et al., 2011). These findings demonstrated the role of ROS in the AgNP-induced DNA damage. The mechanism of action by which AgNPs cause DNA damage is not fully understood. One of the plausible mechanisms by which AgNPs may cause DNA damage is via generation of free radicals (Kim et al., 2011; Foldbjerg and Autrup, 2013). Several *in vitro* studies have demonstrated cellular responses related to oxidative stress after AgNP exposure. Reactive oxygen intermediates are formed when oxidative dissolution of AgNPs occurs, suggesting a direct NP-mediated mechanism (Liu and Hurt, 2010). In previous studies, cytotoxicity induced by 4.7 and 42 nm AgNPs was efficiently prevented by N-acetyl-L-cysteine treatment, which suggested that oxidative stress was primarily responsible for the cytotoxicity of AgNPs. In addition, our previous results also demonstrated that 4.7 nm coated and 42 nm uncoated AgNPs caused an increase in generation of ROS, drastic glutathione depletion and slight, but not statistically significant, inactivation of SOD, and consequently oxidative stress in HepG2, HL-60, NHDF and HPF cells (Ávalos et al., 2014a, b). Thus, genotoxic effects induced by AgNP exposure may occur in human cells, and different modes of action could be involved. ROS produced by exposure to AgNPs could interact with and damage proteins or DNA. It is also possible that AgNPs interact directly with proteins or DNA and cause genotoxic effects (Foldbjerg and Autrup, 2013). Moreover, apart from the damaging effects to cellular proteins, lipids and DNA, an increasing level of ROS triggers the cell to respond by activating pro-inflammatory signalling cascades, and ultimately induces programmed cell death (Nel et al., 2006).

In conclusion, our study showed that 4.7 nm coated and 42 nm uncoated AgNPs induced DNA strand breaks in a dose- and size-dependent manner in human hepatoma and leukaemia cells and in human dermal and pulmonary fibroblasts, as detected by the alkaline comet assay. The smaller AgNPs (4.7 nm) were more genotoxic than the 42 nm AgNPs. Furthermore, the genotoxicity of both AgNPs was also dependent on the cell line, with human pulmonary fibroblasts showing the highest DNA damage. Moreover, 4.7 nm and 42 nm AgNPs were able to cause oxidative DNA lesions (measured as Endo III- and Fpg-sites). However, the oxidative damage was not size-dependent, only differences were observed between the cell lines. HL-60 and NHDF cells showed the greatest oxidative DNA damage; in contrast, HPF cells were the most resistant to Endo III and Fpg oxidation. Thus, the risk of being exposed to silver nanoparticles depends on a number of factors, including exposed cell type, silver nanoparticle size, and likely surface chemistry. Deriving safe exposure limits for silver nanoparticles should therefore be handled by a case-by-case approach. This implies that care has to be taken while processing and formulating nanoparticles until their final, finished product.

## References

- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., Hong, Y. (2008) DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **233**, 404-410.
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S. M., Rowe, J. J. (2010) Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **242**, 263-269.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., Paknikar, K. M. (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. *Toxicol. Lett.* **179**, 93-100.
- Asharani, P. V., Grace, L. K. M., Hande, M. P., Aliyaveetil, S. (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells, *ACS Nano* **3**, 279-290.
- Ávalos, A., Haza, A. I., Mateo, D., Morales, P. (2014a) Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *J. Appl. Toxicol.* **34**, 413-423.
- Ávalos, A., Haza, A. I., Mateo, D., Morales, P. (2014b) Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. *Int. Wound J.* **25**, doi: 10.1111/iwj.12244.
- Boiteux, S. (1993) Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **19**, 87-96.
- Cha, K., Hong, H. W., Choi, Y. G., Lee, M. J., Park, J. H., Chae, H. K., Ryu, G., Myung, H. (2008) Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1893-1899.
- Chen, X., Schluesener, H. J. (2008) Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* **176**, 1-12.
- Collins, A. R., Duthie, S. J., Dobson, V. L. (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* **14**, 1733-1735.
- Colvin, V. L. (2003) The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1166-1170.
- Cunningham, M. J. (2007) Gene-cellular interactions of nanomaterials: genotoxicity to genomics. In: *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects*, eds. Monteiro-Riviere, N. A., Lang Tran, C., pp. 173-196, Informa Healthcare, New York.
- Doetsch, P. W., Henner, W. D., Cunningham, R. P., Toney, J. H., Helland, D. E. (1987) A highly conserved endonuclease activity present in *Escherichia coli*, bovine, and human cells recognizes oxidative DNA damage at sites of pyrimidines. *Mol. Cell Biol.* **7**, 26-32.
- European Commission (2012) Nanomaterials: Commission proposes case by case approach to assessment. *MEMO*, **12**, 732.
- Flower, N. A., Brabu, B., Revathy, M., Gopalakrishnan, C., Raja, S. V. K., Murugan, S. S., Kumaravel, T. S. (2012) Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* **742**, 61-65.
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J., Autrup, H. (2009) PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* **190**, 156-162.
- Foldbjerg, R., Dang, D. A., Autrup, H. (2011) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch. Toxicol.* **85**, 743-750.
- Foldbjerg, R., Autrup, H. (2013) Mechanisms of silver nanoparticle toxicity. *Arch. Bas. App. Med.* **1**, 5-15.
- Gliga, A. R., Skoglund, S., Wallinder, I. O., Fadeel, B., Karlsson, H. (2014) Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part. Fibre Toxicol.* **11**, 11-28.
- Godard, T., Deslandes, E., Lebailly, P., Vigreux, C., Poulain, L., Sichel, F., Poul, J. M., Gauduchon, P. (1999) Comet assay and DNA flow cytometry analysis of staurosporine-induced apoptosis. *Cytometry* **36**, 117-122.
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Hagen, R., Kleinsasser, N. (2011) Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol. Lett.* **201**, 27-33.
- He, W., Zhou, Y. T., Wamer, W. G., Boudreau, M. D., Yi, J. J. (2012) Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles. *Biomaterials* **33**, 7547-7555.
- Hsin, Y. H., Chen, C. F., Huang, S., Shih, T. S., Lai, P. S., Chueh, P. J. (2008) The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* **179**, 130-139.
- Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V. (2010) A review of the *in vivo* and



- vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **40**, 328-346.
- Jovanovic, S. V., Simic, M. G. (1986) One-electron redox potentials of purines and pyrimidines. *J. Phys. Chem.* **90**, 974-978.
- Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S. (2009) In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 6046-6051.
- Karlsson, H. L. (2010) The comet assay in nanotoxicology research. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 651-666.
- Kim, H. R., Kim, M. J., Lee, S. Y., Oh, S. M., Chung, K. H. (2011) Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutat. Res.* **726**, 129-135.
- Kreuter, J., Gelperina, S. (2008) Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* **94**, 271-277.
- Landsiedel, R., Kapp, M. D., Schulz, M., Wiench, K., Oesch, F. (2009) Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitation – many questions, some answers. *Mutat. Res.* **681**, 241-258.
- Li, Y., Chen, D. H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R. A., Zhang, Y., Biris, A. S., Heflich, R. H., Chen, T. (2012) Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutat. Res.* **745**, 4-10.
- Lima, R., Seabra, A. B., Durán, N. (2012) Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* **32**, 867-879.
- Liu, J., Hurt, R. H. (2010) Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 2169-2175.
- Maurer-Jones, M. A., Lin, Y. S., Haynes, C. L. (2010) Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano* **4**, 3363-3373.
- Maynard, A. D., Kuempel, E. D. (2005) Airborne nanostructured particles and occupational health. *J. Nanopart. Res.* **7**, 587-614.
- Mei, N., Zhang, Y., Chen, Y., Guo, X., Ding, W., Ali, S. F., Biris, A. S., Rice, P., Moore, M. N., Chen, T. (2012) Silver nanoparticle-induced mutations and oxidative stress in mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **53**, 409-419.
- Mukherjee, S. G., O'Clonadh, N., Casey, A., Chambers, G. (2012) Comparative *in vitro* cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cells lines. *Toxicol. In Vitro* **26**, 238-251.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622-627.
- Nymark, P., Catalan, J., Suhonen, S., Jarventaus, H., Birkedal, R., Clausen, P. A., Jensen, K. A., Vippola, M., Savolainen, K., Norppa, H. (2013) Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology* **313**, 38-48.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J. (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **113**, 823-839.
- Olive, P. L., Wlodek, D., Durand, R. E., Banath, J. P. (1992) Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell. Res.* **198**, 259-267.
- Olive, P. L., Frazer, G., Banath, J. P. (1993) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat. Res.* **136**, 130-136.
- Panda, K. K., Achary, V. M., Krishnaveni, R., Padhi, B. K., Sarangi, S. N., Sahu, S. N., Panda, B. B. (2011) *In vitro* biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicol. In Vitro* **25**, 1097-1105.
- Park, M. V. D. Z., Neigh, A. M., Vermeulen, J. P., de la Fonteyne, L. J. J., Verharen, H. W., Briedé, J. J., van Loveren, H., de Jong, W. H. (2011) The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 9810-9817.
- Su, J., Zhang, J., Liu, L., Huang, Y., Mason, R. P. (2008) Exploring feasibility of multicolored CdTe quantum dots for *in vitro* and *in vivo* fluorescent imaging. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **8**, 1174-1177.
- Tan, W. B., Jiang, S., Zhang, Y. (2007) Quantum-dot based nanoparticles for targeted silencing of HER2/neu gene via RNA interference. *Biomaterials* **28**, 1565-1571.
- Wallace, W. E., Keane, M. J., Murray, D. K., Chisholm, W. P., Maynard, A. D., Ong, T. M. (2007) Phospholipid lung surfactant and nanoparticle surface toxicity: lessons from diesel soots and silicate dusts. *J. Nanopart. Res.* **9**, 23-38.
- Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van De Meent, D., Dekkers, S., De Jong, W. H., van Zijverden, M., Sips, A. N. J. A. M., Geertsma, R. E. (2009) Nano silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* **3**, 109-138.
- Xia, T., Kovichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., Nel, A. E. (2006) Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* **6**, 1794-1807.
- Yoon, K. Y., Hoon, B. J., Park, J. H., Hwang, J. (2007) Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.* **373**, 572-575.

## Artículo VI

---

***In vivo* genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila*.**

**Food and Chemical Toxicology (2015), 85: 114-119**







Contents lists available at ScienceDirect

## Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## *In vivo* genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila*



Alicia Ávalos<sup>a</sup>, Ana Isabel Haza<sup>a</sup>, Elena Drosopoulou<sup>b</sup>, Penelope Mavragani-Tsipidou<sup>b</sup>, Paloma Morales<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 24 124 Thessaloniki, Greece

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 April 2015

Received in revised form

17 June 2015

Accepted 22 June 2015

Available online 10 July 2015

## Keywords:

*Drosophila melanogaster*

Genotoxicity

Silver nanoparticles

SMART

## ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) with antimicrobial activity are by far the most commercialized nano-compound. They are commonly used in medical products and devices, food storage materials, cosmetics and industrial products. Despite the increasing human exposure to AgNPs, they remain a controversial research area with regard to their toxic and genotoxic effects to biological systems. Although previous data have suggested that AgNPs induce toxicity *in vitro*, the *in vivo* studies on this topic are very limited. In the present study, the potential genotoxic activity of AgNPs of different sizes (4.7 and 42 nm) was evaluated using the *in vivo* Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. Larvae were treated with 25, 30 and 50 µg/ml of AgNPs 4.7 nm, and 250, 500 and 1000 µg/ml of AgNPs 42 nm. Data showed that AgNPs at the applied concentrations did not modify the spontaneous frequencies of spots indicating lack of mutagenic and recombinogenic activity. However, both AgNPs induced pigmentation defects and reduction in locomotor ability in adult flies. Therefore, further experiments must be carried out to gain a better understanding of the mechanism of action of AgNPs to ensure their safe use.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The rapid expansion of nanotechnology has led to the increased number of products containing nano-sized materials. Materials at this scale (<100 nm) typically exhibit nanostructure-dependent properties, such as unique physical properties (optical, electrical, and magnetic) and high chemical reactivity, which make them more attractive for commercial and medical applications (Oberdorster et al., 2005). Silver nanoparticles (AgNPs) are among the most commonly used nanomaterials in numerous consumer products including textiles, cosmetics, food, and health care products for exploiting their strong antimicrobial activity (Cheng et al., 2004; Cohen et al., 2007). Yet, while human population exposed to AgNPs continues to increase with ever-new applications, silver nanoparticles remain a controversial research area with respect to

their toxicity to biological systems (Kim et al., 2010; Demir et al., 2011).

There is growing evidence that AgNPs are highly toxic *in vitro*. It has been reported that AgNPs exposures decreased viability, increased lactate dehydrogenase (LDH) – leakage, inhibited mitochondrial function or increased reactive oxygen species (ROS) production in human hepatoma cells, human leukemia cells, mouse germline stem cells, human fibroblasts and rat adrenal cells (Braydich-Stolle et al., 2005; Hussain et al., 2006; Ávalos et al., 2014a, b). As oxidative stress is related to DNA damage, the genotoxic potential of AgNPs is of increasing interest (Ahamed et al., 2008; Asharani et al., 2009; Chi et al., 2009; Kawata et al., 2009; Foldbjerg et al., 2011; Asare et al., 2012; Nymark et al., 2013). However, studies on the potential genotoxicity such as mutagenicity and carcinogenicity of AgNPs in *in vivo* systems are still scarce and they give controversial results (Kim et al., 2008; Kumari et al., 2009; Ghosh et al., 2012; Demir et al., 2013).

*Drosophila melanogaster* is one of the most experimental accessible model organisms used in biology. Due to the extensive

\* Corresponding author.

E-mail address: [pmorales@vet.ucm.es](mailto:pmorales@vet.ucm.es) (P. Morales).

knowledge on its genetics and genomics, the high homology between fly and human genes and its short lifespan, the fruit fly is an ideal model to examine toxicity and genotoxicity of nanomaterials *in vivo* (Ong et al., 2014). Until now, only a few studies have used *Drosophila* to determine the potential genotoxic harmful effects of nanomaterials (Demir et al., 2011; Vecchio et al., 2012; Vales et al., 2013).

In the present work, the mutagenic and/or recombinogenic activity of two AgNPs of different size (4.7 and 42 nm) was assessed employing the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. This test is a sensitive, rapid and cheap *in vivo* assay, able to detect a wide variety of genetic alterations including somatic recombination (Graf et al., 1984, 1989; Graf and van Schaik, 1992). The assay is based on the loss of the heterozygosity (LOH) of two genetic markers in the third chromosome involved in the metabolic pathways of wing hairs-multiple wing hair (*mwh*) and flare<sup>3</sup> (*flr*<sup>3</sup>). Genetic alterations induced in mitotically dividing cells of a developing wing disc, may give rise to clone(s) of *mwh* and/or *flr*<sup>3</sup> cells, which are visible on the wing surface of the adult fly (Graf et al., 1984). Any increase in the clone frequency as compared to the control reflects genotoxic activity, the extent of which is characterized by the frequency of the clone induction (Graf et al., 1984, 1998). Single spots indicate the occurrence of either a point mutation, a chromosomal alteration, or mitotic recombination. However, twin spots are exclusively derived from mitotic recombination. Since both somatic mutation and mitotic recombination events are found to be associated with carcinogenesis (Jones et al., 2008; Sengstag, 1994), information derived by this test is expected to contribute to the evaluation on the safety of using AgNPs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All chemicals were reagent grade or higher and were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise specified. Water-based solutions of silver nanoparticles of 4.7 nm PEI (polyetherimide) and PVP (polyvinylpyrrolidone) coated silver nanoparticles (AgNPs) and 42 nm uncoated AgNPs were purchased from Nanogap Subparticles (A Coruña, Spain). A summary of the characterization according to the manufacturer's data is available in Table 1. AgNPs were also characterized in our laboratory by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) as previously described (Ávalos et al., 2014a, b). Stock solutions of AgNPs were diluted to the required concentrations using distilled water. Faure's solution was prepared by mixing 100 g distilled water (H<sub>2</sub>O), 100 g chloral hydrate (C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O.H<sub>2</sub>O), 40 g glycerine (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) and 60 g arabic gum. Mitomycin-C (MMC) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. *Drosophila* strains

Three *Drosophila* stocks (kindly provided by Dr. Spano) were used in the present study: (i) the multiple wing hair strain (with genetic constitution *y; mwh j*), (ii) the flare-3 strain (with genetic

constitution *flr<sup>3</sup>/In (3LR)TM3, ri p<sup>9</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>5</sup>*), and (iii) the *ORR/ORR* (with genetic constitution *ORR; flr<sup>3</sup>/In (3LR)TM3, ri p<sup>9</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>5</sup>*) (De Rezende et al., 2009, 2013).

Two crosses were performed: (i) Standard (ST) cross (virgin females of the strain *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>5</sup>* crossed with *mwh/mwh* males) (Graf et al., 1984, 1989) and (ii) High bioactivation (HB) cross (virgin females of the strain *ORR; flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>5</sup>* with *mwh/mwh* males) (Graf and van Schaik, 1992). The latter cross improves the performance of the wing SMART in the case of promutagens activated via cytochrome P450-dependent metabolic pathways (Saner et al., 1996). The stocks and the crosses were maintained at 24 ± 1 °C, at a photoperiod 16:8 (light:dark) on a yeast-glucose medium.

### 2.3. Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

The experiments were carried out following the principles and the basic procedures presented by Graf et al. (1984) and Würdler and Vogel (1986). Thus, eggs obtained by parental crosses were collected during an 8-h period in culture bottles with an agar–agar base (4% w/v) topped with a thick layer of live yeast supplemented with sucrose. Three days after egg laying, larvae in the third stage of embryonic development were washed out of the bottles with Ringer's solution and collected in a stainless steel strainer. Series of 40 larvae were transferred for chronic feeding to treatment vials containing 0.85 g of *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply, Burlington, NC, USA) rehydrated with 4 ml of different concentrations of AgNPs 4.7 nm (25, 30, and 50 µg/ml) and AgNPs 42 nm (250, 500 and 1000 µg/ml). Mitomycin-C (MMC) (2.5 µg/ml) was used as positive control. Larvae were fed on these cultures for the rest of their larval life (approximately 48 h). The adult flies that emerged from the crosses mentioned above were selected and stored in 70% v/v ethanol/glycerol (1:1, v/v). Both crosses produced two types of progeny, easily distinguished by the *Bd<sup>5</sup>* marker: (i) marker-heterozygous (MH) flies (*mwh/+flr<sup>3</sup>*) with phenotypically wild-type wings and (ii) balancer-heterozygous (BH) flies (*mwh/TM3, Bd<sup>5</sup>*) with phenotypically serrate wings. The wings of the trans-heterozygous (*mwh/+flr<sup>3</sup>*) were removed under a stereoscope with a pair of entomological tweezers, mounted in Faure's solution and scored at 400× magnification for the presence of mosaic spots. The rest individuals were excluded from analysis, because in the *mwh/TM3, Bd<sup>5</sup>* flies recombinational events are suppressed (Graf and van Schaik, 1992). The spots observed on the wings of the trans-heterozygous were grouped into four categories based on the size, number and type of cells showing malformed wing hairs as: (i) small single spots (with one or two affected cells, either *mwh* or *flr<sup>3</sup>*), (ii) large single spots (with three or more affected cells, either *mwh* or *flr<sup>3</sup>*), (iii) twin spots (consisting of both *mwh* and *flr<sup>3</sup>* subclones), and (iv) total spots (Graf et al., 1984). Single spots (*mwh* or *flr<sup>3</sup>*) are produced by various genetic events including somatic point mutations, deletions and other types of structural rearrangements as well as by mitotic recombination between the two marker genes, while twin spots (*mwh* and *flr<sup>3</sup>*) are produced exclusively by mitotic recombination occurring between the proximal marker *flr<sup>3</sup>* and the chromosome 3 centromere (Graf et al., 1984). For comparative analysis, parallel experiments using distilled water were carried out as the negative controls. A well-

**Table 1**  
Characteristics of AgNPs obtained from NanoGap. Nd no information provided.

| Code   | Particles | Avg* ± SD (nm) | Dispersion solution                            | Density (g/ml) | Density of particle (part/l) | Color                        | pH  |
|--------|-----------|----------------|--|----------------|------------------------------|------------------------------|-----|
| 2106-W | AgNP 4.7  | 4.7 ± 1        | Aqueous solution with PEI and PVP <sup>a</sup> | 1.024          | 1.75 × 10 <sup>19</sup>      | Black, yellow (when diluted) | 9.3 |
| 2103-W | AgNP 42   | 42 ± 9         | Aqueous solution                               | 1.010          | Nd                           | Brown                        | Nd  |

\*As provided by company.

<sup>a</sup> PEI, polyetherimide, PVP, polyvinylpyrrolidone.

known mutagen, mitomycin-C (MMC), at concentration 2.5 µg/mL, served as the positive control. Ten replicates per treatment were performed and 50 wing samples per treatment were randomly selected for genotoxic analysis. All experiments were performed at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  and 60% RH. A total of about 550 wings were scored in this study.

#### 2.4. Statistical analysis

For the evaluation of induced effects, the frequency of spots per wing in the treated series was compared with that of the negative control. Statistical analysis of the data was done using the multiple-decision procedure (Selby and Olson, 1981; Frei and Würzler, 1988), which is based on the conditional binomial test and the chi-squared test (K. Pearson's criterion) (Kastenbaum and Bowman, 1970; Margolin et al., 1983). Briefly, the multiple-decision procedure of Selby and Olson (1981) is based on testing the following two hypotheses: (1) the mutation frequency (induced + spontaneous) of treated flies is not higher than the mutation frequency in the appropriate pooled control, and (2) the induced mutation frequency of the treated flies is no less than  $m$  times as high as the observed spontaneous mutation frequency in the control. As far as small single spots and total spots are concerned, the multiplication factor,  $m$ , equals 2, whereas  $m$  equals 5 when the genotoxic potential of large single spots and twin spots is evaluated. Each hypothesis was tested at the 5% significance level. The following four decisions are possible: (1) accept both hypotheses; these cannot be true simultaneously, so no conclusions can be drawn-inconclusive result; (2) accept the first hypothesis and reject the second hypothesis-negative result; (3) reject the first hypothesis and accept the second hypothesis-positive result; or (4) reject both hypotheses-weak effect.

### 3. Results

In the present study, AgNPs 4.7 and 42 nm were tested chronically (approximately 48 h) on the larval progeny (third instar larvae) from the ST and the HB cross. The ranges of doses used in this study were determined based on previous viability experiments (results not shown). Taking into account that the number of emerging adults must be high enough to perform the genotoxicity experiments, a range between 25 and 50 µg/ml and 250–1000 µg/ml was chosen for 4.7 and 42 nm AgNPs, respectively. The survival rate of concentrations chosen was 70–80% for ST cross, and 60–70% for HB cross.

The analysis of the ST cross of the SMART assay together with negative and positive control experiment is summarized in Table 2.

The statistical analysis showed inconclusive results ( $p < 0.05$ ) in the three spot categories after chronic treatment of *Drosophila* with AgNPs 4.7 nm (at all tested doses), compared to those of the negative controls. Similar results were also found with the larger nanoparticles (AgNPs 42 nm). The inconclusive results regarding the above-mentioned AgNPs have minimal biological significance, since the frequency of total spots was slightly different than that in the control series.

The results obtained with HB cross by the SMART assay together with negative and positive control experiment are presented in Table 3. As can be seen, neither of the AgNPs was able to induce significant increases in the frequency of mutant clones at concentrations of 30–50 µg/ml (AgNPs 4.7 nm) and 500–1000 µg/ml (AgNPs 42 nm). For smaller concentrations (25 µg/ml; AgNPs 4.7 nm and 250 µg/ml; AgNPs 42 nm) the statistical analysis gave inconclusive results ( $p < 0.05$ ), which as in the case of the ST cross, are of minimal biological significance.

In conclusion, both AgNPs (4.7 and 42 nm), at least at the concentrations tested here, do not appear to be genotoxic under our *in vivo* experimental conditions. Mitomycin-C at concentrations of 2.5 µg/mL gave significant positive results for all four categories of spots (Tables 2 and 3). However, despite the absence of the genotoxic effects, ingestion of AgNPs (4.7 and 42 nm) during the larval stage resulted in cuticular and melanization defects and reduction in locomotor ability in adults from both crosses (Fig. 1). These data suggest that exposure to AgNPs during larval development specifically affects pigmentation in adult flies.

### 4. Discussion

AgNPs, which have antibacterial properties, have been integrated into hundreds of consumer products and their use in daily life is constantly increasing. As a consequence, industry workers, consumers and environment are anticipated to be increasingly exposed to AgNPs. Even though they are widely used and belong to the best studied nanoparticles, the mechanisms of the biological effects of AgNPs are still not fully understood (Wojewódzka et al., 2011). AgNPs toxicology study has been confined to the classical *in vitro* toxicity test methods (Ghosh et al., 2012). Despite the increasing interest on the genotoxic risk related with the new emerging nanomaterials (Landsiedel et al., 2009), only few data exist on the *in vivo* genotoxicity of AgNPs (De Lima et al., 2012). For this reason, in the present work adds information on the potential mutagenic and recombinogenic activity of two AgNPs of different size (4.7 and 42 nm) employing the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila*.

In the present study, the results obtained in both crosses (ST and

**Table 2**

Summary of the results obtained in the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila melanogaster* with the standard cross (ST), after larvae treatment with different concentrations of AgNPs of 4.7 and 42 nm.

| Treatment            | Number of wings | Frequency of spots per wing and diagnosis <sup>a</sup> |                    |                |                |
|----------------------|-----------------|--|--------------------|----------------|----------------|
|                      |                 | Small single spots                                     | Large single spots | Twin spots     | Total spots    |
| Standard cross       |                 | <i>m</i> = 2.0   | <i>m</i> = 5.0     | <i>m</i> = 5.0 | <i>m</i> = 2.0 |
| Control              | 50              | 0.20 (10)  | 0.02 (1)           | 0.00 (0)       | 0.22 (11)      |
| MMC (2.5 µg/ml)      | 50              | 0.54 (27) +  | 0.34 (17) +        | 0.16 (8) +     | 1.04 (52) +    |
| (AgNP 4.7) 25 µg/ml  | 50              | 0.22 (11) i  | 0.04 (2) i         | 0.00 (0) i     | 0.26 (13) i    |
| (AgNP 4.7) 30 µg/ml  | 50              | 0.28 (14) i  | 0.04 (2) i         | 0.00 (0) i     | 0.32 (16) i    |
| (AgNP 4.7) 50 µg/ml  | 50              | 0.26 (13) i  | 0.04 (2) i         | 0.00 (0) i     | 0.30 (15) i    |
| (AgNP 42) 250 µg/ml  | 50              | 0.20 (10) i  | 0.00 (0) i         | 0.00 (0) i     | 0.20 (10) i    |
| (AgNP 42) 500 µg/ml  | 50              | 0.20 (10) i  | 0.04 (2) i         | 0.02 (1) i     | 0.26 (13) i    |
| (AgNP 42) 1000 µg/ml | 50              | 0.16 (8) –   | 0.00 (0) i         | 0.00 (0) i     | 0.16 (8) –     |

Symbols next to values signify the following: +, positive mutagenic effect; –, no mutagenic effect; i, inconclusive effect;  $m$  is the multiplication factor<sup>1</sup> ( $p = 0.05$ ).

<sup>a</sup> The number of mutant spots is given in parenthesis. Statistical diagnosis according to Frei and Würzler (1988).



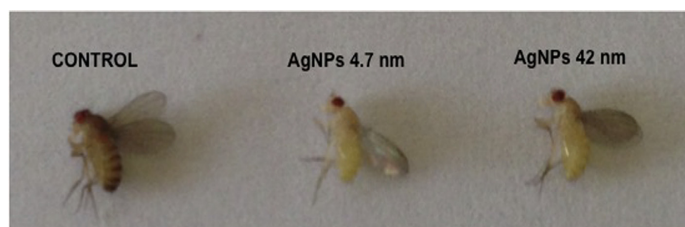
**Table 3**

Summary of the results obtained in the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila melanogaster* with the high bioactivation cross (HB), after larvae treatment with different concentrations of AgNPs of 4.7 and 42 nm.

| Treatment                | Number of wings | Frequency of spots per wing and diagnosis <sup>a</sup> |                    |                |                |
|--------------------------|-----------------|--|--------------------|----------------|----------------|
|                          |                 | Small single spots                                     | Large single spots | Twin spots     | Total spots    |
| High bioactivation cross |                 | <i>m</i> = 2.0   | <i>m</i> = 5.0     | <i>m</i> = 5.0 | <i>m</i> = 2.0 |
| Control                  | 50              | 0.30 (15)  | 0.04 (2)           | 0.08 (4)       | 0.42 (21)      |
| MMC (2.5 µg/ml)          | 56              | 0.89 (50) +  | 0.71 (40) +        | 0.25 (14) +    | 1.86 (104) +   |
| (AgNP 4.7) 25 µg/ml      | 50              | 0.48 (24) i  | 0.04 (2) i         | 0.06 (3) –     | 0.58 (29) i    |
| (AgNP 4.7) 30 µg/ml      | 50              | 0.36 (18) i  | 0.02 (1) i         | 0.00 (0) –     | 0.38 (19) –    |
| (AgNP 4.7) 50 µg/ml      | 50              | 0.36 (18) i  | 0.08 (4) i         | 0.02 (1) –     | 0.46 (23) –    |
| (AgNP 42) 250 µg/ml      | 50              | 0.42 (21) i  | 0.12 (6) i         | 0.02 (1) –     | 0.56 (28) i    |
| (AgNP 42) 500 µg/ml      | 50              | 0.24 (12) –  | 0.06 (3) i         | 0.00 (0) –     | 0.30 (15) –    |
| (AgNP 42) 1000 µg/ml     | 50              | 0.22 (11) –  | 0.02 (1) i         | 0.08 (4) –     | 0.32 (16) –    |

Symbols next to values signify the following: +, positive mutagenic effect; –, no mutagenic effect; i, inconclusive effect; *m* is the multiplication factor<sup>1</sup> (*p* = 0.05).

<sup>a</sup> The number of mutant spots is given in parenthesis. Statistical diagnosis according to Frei and Würdler (1988).



**Fig. 1.** *Drosophila* treated with AgNPs exhibit defects in cuticle development and melanization. *Drosophila* exposed to 25 µg/ml and 250 µg/ml (AgNPs 4.7 and 42 nm, respectively) via ingestion have unpigmented cuticle as compared to normal control *Drosophila*.

HB crosses) showed that AgNPs of 4.7 and 42 nm did not induce increased frequencies of wing spots indicating absence of mutagenic or recombinogenic activity within the range of concentrations tested (Tables 2 and 3). The positive control carried out with mitomycin-C showed a clear positive response, supporting the validity of the negative results observed in this study.

A previous *in vitro* study of our laboratory on the potential genotoxic effects of the same AgNPs (4.7 and 42 nm), using the comet assay and four relevant human cell lines (Ávalos et al., 2014c) showed that both AgNPs induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in all cell lines. This is in accordance with existing evidence that a variety of AgNPs may be genotoxic *in vitro* in different cell lines (Kim et al., 2010; Ghosh et al., 2012; Xu et al., 2012). However, *in vitro* results may not fully reflect the natural genotoxic potential of AgNPs. Under *in vivo* conditions, AgNPs may act considerably different than under *in vitro* conditions. Moreover, *in vivo* concentrations of AgNPs may differ from those *in vitro* (Klien and Godnić-Cvar, 2012). To our knowledge, there is only one study about genotoxicity of AgNPs by SMART assay (Demir et al., 2011), which does not agree with our data. The size and origin of the nanoparticles used in the two studies may account for the different results. In agreement with our results, others *in vivo* studies have not observed genotoxic effects of AgNPs. In particular, *in vivo* studies using Sprague–Dawley rats did not show increases in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes after 90-days inhalation AgNPs of 18 nm and 28–days oral treatment with AgNPs of 60 nm (Kim et al., 2008, 2011). On zebrafish embryos, AgNPs with different coatings (starch, bovine serum albumin and polyvinyl alcohol) and sizes (8–15 nm, 10–20 nm and 5–35 nm) also showed no genotoxicity up to concentrations of 25 µg/ml (Asharani et al., 2008, 2011). The different findings in potential genotoxic and carcinogenic risks of AgNPs are possibly due to the

insufficient characterization of the test material, difference in the experimental design, use of different animal models and species, difference in dosimetry, and different targeting organs (Becker et al., 2011).

In spite of the non-genotoxic effects detected, we observed that AgNPs (4.7 and 42 nm) ingestion during the larval stage resulted in cuticular and melanization defects (Fig. 1) and reduction in locomotor ability in adults from both crosses at all tested doses. These same effects were observed in studies carried out by Posgai et al. (2011), Key et al. (2011) and Armstrong et al. (2013) after ingestion of different AgNPs during the larval stage. Pigmentation defects can be linked to developmental abnormalities including reduction in locomotor ability (Walter et al., 1991; Drapeau et al., 2003; Suh and Jackson, 2007). Melanin synthesis is highly conserved biochemical mechanism throughout the animal kingdom whereby melanin is made from the catecholamine precursors dopa and dopamine, which are synthesized from tyrosine (Prota, 1992).

On the other hand, dopamine is known to generate reactive oxygen species (ROS), which can affect the nervous system and overall negatively affect longevity (Perez and Hastings, 2004). Thus, de-pigmentation may be due to induction of a stress response, and may be associated with increased expression of heat shock protein 70 (hsp 70) (Denman et al., 2008; Galvan and Alonso-Alvarez, 2009; Glassman, 2011; Ong et al., 2014).

In summary, AgNPs 4.7 and 42 nm did not exhibit any mutagenic or recombinogenic activity in *Drosophila* under our *in vivo* experimental conditions. However, both AgNPs were able to induce pigmentation defects and reduction in locomotor ability in adult flies after ingestion of AgNPs during the larval stage. Therefore, further experiments must be carried out to gain a better understanding on the mechanism of action of AgNPs to ensure their safe use.

## Acknowledgments

This work has been supported by Grant AGL2010-16561 from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). A. Ávalos is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). We thank Dr. Spano for providing us the *D. melanogaster* strains. We also thank Sofia Tsamadou, Voula Kirizaki and Maria Anagnostopoulou for their technical assistance.

## Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.06.024>.

## References

- Ahamed, M., Karns, M.M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S., Schlager, J., Hong, Y., 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 404–410.
- Armstrong, N., Ramamoorthy, M., Lyon, D., Jones, K., Duttaroy, A., 2013. Mechanism of silver nanoparticles action on insect pigmentation reveals intervention of copper homeostasis. *PLoS One* 8 (1), e53186.
- Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W.J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., Brunborg, G., 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 291 (1–3), 65–72.
- Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, S., 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19, 255102. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/19/25/255102>.
- Asharani, P.V., Kah Mun, M.P., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano Lett.* 2, 279–290.
- Asharani, P.V., Lianwu, Y., Gong, Z., Valiyaveetil, S., 2011. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology* 5, 43–54.
- Ávalos, A., Haza, A.I., Mateo, D., Morales, P., 2014a. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *J. Appl. Toxicol.* 34, 413–423.
- Ávalos, A., Haza, A.I., Mateo, D., Morales, P., 2014b. Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. *Int. Wound J.* <http://dx.doi.org/10.1111/iwj.12244>.
- Ávalos, A., Haza, A.I., Morales, P., 2014c. Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts. *Folia Biol. Prague* 61, 33–42.
- Becker, H., Herzberg, F., Schulte, A., Kolossa-Gehring, M., 2011. The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulating them. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 231–238.
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J., Hofmann, M.C., 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian stem cells. *Toxicol. Sci.* 88, 412–419.
- Cheng, D., Yang, J., Zhao, Y., 2004. Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use. *Chin. Med. Equip. J.* 4, 26–32.
- Chi, Z., Liu, R., Zhao, L., Qin, P., Pan, X., Sun, F., Hao, X., 2009. A new strategy to probe the genotoxicity of silver nanoparticles combined with cetylpyridine bromide. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 72, 577–581.
- Cohen, M.S., Stern, J.M., Vanni, A.J., Kelley, R.S., Baumgart, E., Field, D., Libertino, J.A., Summerhayes, I.C., 2007. In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surg. Infect.* 8, 397–403.
- De Lima, R., Seabra, A.B., Durán, N., 2012. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 32, 867–879.
- De Rezende, A.A.A., Graf, U., Guterres, Z.R., Kerr, W.E., Spanó, M.A., 2009. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1466–1472.
- De Rezende, A.A.A., Munari, C.C., De Oliveira, P.F., Ferreira, N.H., Tavares, D.C., Silva, M.L.A., Rezende, K.C.S., Spanó, M.A., 2013. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. *Food Chem. Toxicol.* 55, 645–652.
- Demir, E., Vales, G., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2011. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Nanotoxicology* 5, 417–424.
- Demir, E., Turna, F., Vales, G., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2013. In vivo genotoxicity assessment of titanium, zirconium and aluminium nanoparticles, and their microparticulated forms, in *Drosophila*. *Chemosphere* 93, 2304–2310.
- Denman, C.J., McCracken, J., Hariharan, V., Klarquist, J., Oyarbide-Valencia, K., Guevara-Patino, J.A., Le Poole, I.C., 2008. HSP70i accelerates depigmentation in a mouse model of autoimmune vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 128 (8), 2041–2048.
- Drapeau, M.D., Radovic, A., Wittkopp, P.J., Long, A.D., 2003. A gene necessary for normal male courtship, yellow, acts downstream of fruitless in the *Drosophila melanogaster* larval brain. *J. Neurobiol.* 55 (1), 53–72.
- Foldbjerg, R., Dang, D.A., Autrup, H., 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch. Toxicol.* 85, 743–750.
- Frei, H., Würzler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297–308.
- Galvan, I., Alonso-Alvarez, C., 2009. The expression of melanin-based plumage is separately modulated by exogenous oxidative stress and a melanocortin. *Proc. Biol. Sci.* 276 (1670), 3089–3097.
- Ghosh, M., Manivannan, J., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S.K., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A., 2012. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat. Res.* 749, 60–69.
- Glassman, S.J., 2011. Vitiligo, reactive oxygen species and T-cells. *Clin. Sci. (Lond.)* 120 (3), 99–120.
- Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59–67.
- Graf, U., Würzler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen* 6 (2), 153–188.
- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A.J., Würzler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222, 359–373.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J., Wurler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402, 203–209.
- Hussain, S., Javorina, A., Schrand, A., Duhart, H., Ali, S., Schlager, J., 2006. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol. Sci.* 92 (2), 456–463.
- Jones, S., Chen, W.D., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerenwinkel, N., Antal, T., Traulsen, A., Nowak, M.A., Siegel, C., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Willis, J., Markowitz, S.D., 2008. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4283–4288.
- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527–549.
- Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S., 2009. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6046–6051.
- Key, S.C., Reaves, D., Turner, F., Bang, J.J., 2011. Impacts of silver nanoparticle ingestion on pigmentation and developmental progression in *Drosophila*. *Atlas J. Biol.* 1 (3), 52–61.
- Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Yu, I.J., 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 20, 575–583.
- Kim, Y.J., Yang, S.I., Ryu, J.C., 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosilver in mammalian cell lines. *Mol. Cell. Toxicol.* 6, 119–125.
- Kim, H.R., Kim, M.J., Lee, S.Y., Oh, S.M., Chung, K.H., 2011. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutat. Res.* 726, 129–135.
- Klien, K., Godnić-Cvar, J., 2012. Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on in vivo studies. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 63, 133–145.
- Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.* 407, 5243–5246.
- Landsiedel, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K., Oesch, F., 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations – many questions, some answer. *Mutat. Res.* 681, 241–258.
- Margolin, B.H., Collings, B.J., Mason, J.M., 1983. Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environ. Mutagen* 5, 705–716.
- Nymark, P., Catalan, J., Suhonen, S., Jarventausta, H., Birkedal, R., Clausen, P.A., Jensen, K.A., Vippola, M., Savolainen, K., Norppa, H., 2013. Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology* 313, 38–48.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Ong, C., Yung, L.L., Cai, Y., Bay, B., Baeg, G., 2014. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology* 940405. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390>.
- Perez, R.G., Hastings, T.G., 2004. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J. Neurochem.* 89 (6), 1318–1324.
- Posgai, R., Cipolla-McCulloch, C.B., Murphy, K.R., Hussain, S.B., Rowe, J.J., Nielsen, M.G., 2011. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: size, coatings and antioxidants matter. *Chemosphere* 85, 34–42.
- Protá, G., 1992. Melanins and Melanogenesis. Academic Press, London.
- Saner, C., Weibel, B., Würzler, F.E., Sengstag, C., 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen* 27, 46–58.
- Selby, P.B., Olson, W.H., 1981. Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* 83, 403–418.
- Sengstag, C., 1994. The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.* 24 (4), 323–353.
- Suh, J., Jackson, F.R., 2007. *Drosophila* ebony activity is required in glia for the



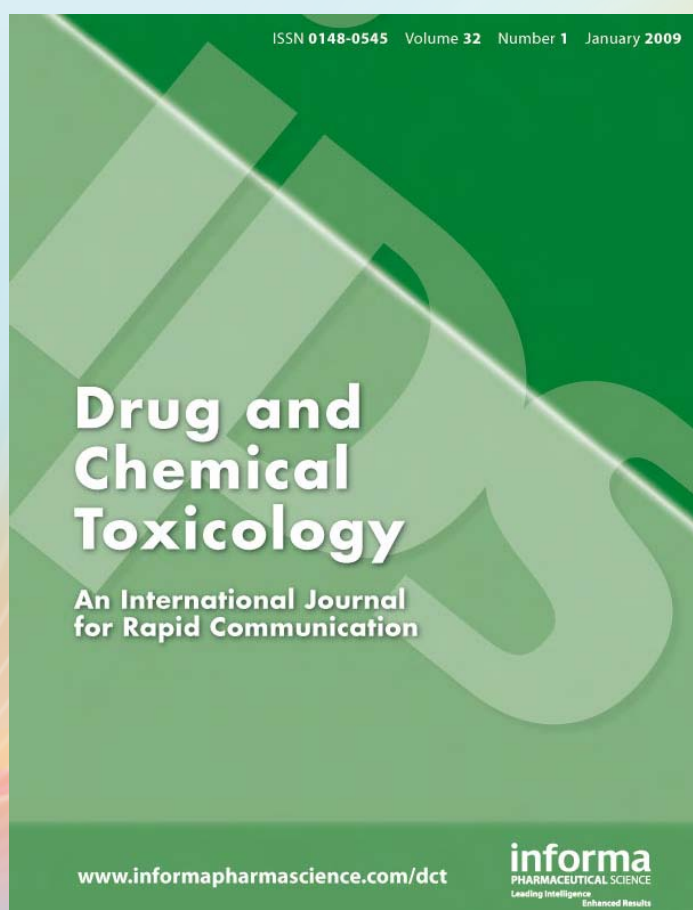
- circadian regulation of locomotor activity. *Neuron* 55 (3), 435–447.
- Vales, G., Demir, E., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2013. Genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions in *Drosophila*. *Nanotoxicology* 7, 462–468.
- Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti, V., Malorano, G., Rizello, L., Sabella, S., Cingolani, R., Pompa, P.P., 2012. Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Nanomedicine* 8, 1–7.
- Walter, M.F., Black, B.C., Afshar, G., Kermabon, A.Y., Wright, T.R., Biessmann, H., 1991. Temporal and spatial expression of the yellow gene in correlation with cuticle formation and dopa decarboxylase activity in *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 147 (1), 32–45.
- Wojewódzka, M., Lankoff, A., Dusinska, M., Brunborg, G., Czerwinska, J., Iwanenko, T., Stepkowski, T., Szumiel, I., Kruszewski, M., 2011. Treatment with silver nanoparticles delays repair of X-ray induced DNA damage in HepG2 cells. *Nukleonika* 56, 29–33.
- Würgler, F.E., Vogel, E.W., 1986. In: de Serres, F.J. (Ed.), *Chemical, Principles and Methods for Their Detection*. Plenum, New York.
- Xu, L., Li, X., Takemura, T., Hanagata, N., Wu, G., Chou, L.L., 2012. Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. *J. Nanobiotechnology* 10, 16–26.

## Artículo VI

---

### **Manufactured silver and gold nanoparticles-induced apoptosis by caspase-pathway in cell lines**

**Drug and Chemical Toxicology (Enviado)**





## Manufactured silver and gold nanoparticles-induced apoptosis by caspase-pathway in cell lines

Alicia Ávalos, Paloma Morales and Ana Isabel Haza

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (Spain).

(i) Corresponding author: Ana Isabel Haza, Department of Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Faculty of Veterinary, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain. Phone: +34-91-394 37 47; fax: +34-91-394 37 43; Email: hanais@vet.ucm.es.

*Running Head:* In vitro apoptosis induction by AgNPs and AuNPs

### ABSTRACT

Metallic nanoparticles (NPs) have emerged as an important class of nanomaterials for a wide range of industrial and medical applications. Due to the intensive commercial applications, risk assessment of these nanoparticles is of great importance. In the present study, the human hepatoma (HepG2) and leukemia (HL-60) cells were used to characterize the apoptotic effects of silver nanoparticles (AgNPs) (4.7 and 42 nm) and gold nanoparticles (AuNPs) (30 nm). Apoptotic cells were identified by chromatin condensation and flow cytometry analysis, using Annexin V/PI, TUNEL and caspase activation assays. Flow cytometry analysis showed that the three metallic NPs induced apoptotic cell death in a concentration and time dependent-manner. Moreover, the three NPs induced activation of caspase-3 and -7 in HepG2 and HL-60 cells. Apoptotic effects were stronger after exposure of both cell lines with 4.7 nm AgNPs than those obtained with 42 nm AgNPs and 30 nm AuNPs. In conclusion, AgNPs (4.7 and 42 nm) and AuNPs (30 nm) induced apoptosis in HepG2 and HL-60 cells via the caspase dependent pathway. The smaller AgNPs (4.7 nm) had a greater ability to induce apoptosis in both cell lines.

Keywords: Apoptosis; Caspases; Gold nanoparticles; Human tumoral cells; Silver nanoparticles.

### Introduction

Nanotechnology has emerged as a broad and rapidly developing field over the past few decades, since nanoparticles (NPs) are widely utilized for applications within the commercial, medical and environmental sectors (Nandedkar et al. 2009, Vance et al. 2015, Sanchez and Solobev 2010, Dreher 2004). Therefore, potential occupational and public exposure to NPs is inevitable as they become more widely used and, as a result, nanotoxicology research is now gaining attention (Iavicoli et al. 2010). Evidence is accumulating that NPs differ significantly from traditional materials and may cause different toxicities due to their structure and chemistry (Dhawan and Sharma 2010). Therefore, improved understanding of the potential risks associated with exposure to nanomaterials is necessary (Maynard et al. 2006).

Metallic nanoparticles are important objects of study in modern material science due to their properties (Schmid 2004). Gold (AuNPs) and silver (AgNPs) nanoparticles due to the good intrinsic properties i.e. high chemical stability, well-controlled size and surface functionalization (Söderstjerna et al. 2014) and their antibacterial effect, have been intensively studied for commercial and clinical use. They are often applied in numerous consumer products including textiles, cosmetics, food, and health care (Sintubin et

al. 2012). However, in order for their biomedical utility to be fully explored, it is imperative that the factors governing their toxicity be completely understood.

Regarding toxicity of AuNPs, the published results are contradictory (Connor et al. 2005, Shukla et al. 2005, Goodman et al. 2004, Pan et al. 2009). The conflicting results could arise from variability of the toxicity assays, cell lines and chemical/physical properties of the NPs used. However, there has been a general consensus that AgNPs exposure induces toxicity across a variety of cancer and normal cell lines (Yoon et al. 2007). The proposed mechanism of cytotoxic effects of AgNPs and AuNPs was the induction of reactive oxygen species (ROS) production which was supported by studies showing that in vitro exposure to NPs cause reduction of GSH, elevated ROS levels and lipid peroxidation (Arora et al. 2008, Paino et al. 2012, Kim et al. 2009; Ávalos et al. 2015a). Furthermore, AgNPs and AuNPs-mediated ROS increase was associated with DNA damage and apoptosis (Foldbjerg et al. 2009, Di Guglielmo et al. 2012).

Different types of cell death, i.e. apoptosis, necrosis and autophagy, contribute to the pathophysiology of different human disorders (Lowe and Lin 2000).

Apoptosis is a selective process of physiological cell demise that regulates the balance between cell proliferation and cell death (Zang et al., 2009). Various types of cellular stress stimuli have been shown to trigger apoptosis, including chemotherapeutic agents, irradiation, absence of growth factors, factors trophic, glucocorticoids,  $\gamma$  radiation, activation of death receptors, oxidative stress, DNA damage and endoplasmic reticulum stress due to the exposure of cells to conditions such as serum and glucose starvation, inhibition of protein glycosylation, disturbance of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and oxygen deprivation (Fulda et al., 2010). It is well recognized as a distinctive mode of programmed cell death, critical in development of multi-cellular organisms, regulation of the immune system, and clearance of abnormal cells (Krampe and Al-Rubeai 2010, Ulukaya et al. 2011, Pereira and Amarante-Mendes 2011). Apoptosis occurs as a defense mechanism when cells are damaged beyond repair capacity, especially when disease- or toxicant-mediated damage affects cellular DNA, and cellular repair mechanisms are unable to deal with the injury (Kim and Ryu 2013). This type of cell death is characterized by distinct morphological changes such as membrane blebbing, nuclear condensation and disorganization, and fragmentation of genomic DNA (Miao et al. 2011). It has been suggested that apoptosis would be important mechanism for AgNPs and AuNPs- induced toxicity employing various kinds of cultured cells and animal (Sanpui et al. 2011, Choi et al. 2010, Chuang et al. 2013).

In apoptosis, cells activate enzymes that degrade nuclear DNA, in addition to nuclear and cytoplasmic proteins. The caspases, a family of cysteine proteases, play a central role in apoptosis through a protease cascade including the initiator caspases (caspase-8 and -9) and the effector caspases (caspase-3, -6 and -7) (Taylor et al. 2008). Activation of caspases in response to environmental toxicants can be initiated through stimulation of the extrinsic (receptor) pathway or the intrinsic (mitochondrial) pathway (Franco et al. 2009, Robertson and Orrenius 2000). In this context, caspase-3 is a crucial molecule since it is activated by mitochondria-dependent and – independent apoptotic pathways (Kim and Ryu, 2013).

Since human exposure to NPs can occur through several routes, the study of the specific toxic response of the different organs exposed is crucial (Oberdorster et al. 2005). For that reason, human hepatoma (HepG2) and leukemia cells (HL-60) have been used in our study. HepG2 cells were used because the liver is a primary site of AgNPs and AuNPs accumulation following exposure (Johnston et al. 2010) and HL-60 cells were used to investigate the effect of AgNPs and AuNPs on blood. Therefore, the aim of this study was to investigate the induction of apoptosis by AgNPs

(4.7 and 42 nm) and AuNPs (30 nm) using various methods in two human cell lines.

#### **Material and methods**

##### *Chemicals*

All chemicals were reagent grade or higher and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise specified. Water-based suspension of silver (4.7 and 42 nm) and gold nanoparticles (30 nm) were purchased from Nanogap Subparticles (A Coruña, Spain) and CymitQuímica (Barcelona, Spain), respectively. Stock suspension of AgNPs and AuNPs were diluted to the required concentrations using the respective cell culture medium. In order to reduce agglomeration the suspensions were mixed using vortex for 20 s and sonicated for 2 x 20 s pause in between using a sonicator probe. Etoposide and Ethidium bromide were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO). Hoechst 33342 was obtained from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

##### *Nanoparticles Characterization*

The characterization of AgNPs and AuNPs to determine its primaries sizes, morphology, agglomeration and size distribution in aqueous solution and after incubation in cell-free culture media by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) was conducted in previous studies (Ávalos et al., 2014; Mateo et al., 2014).

##### *Cell culture*

Human leukemia cells (HL-60) and human hepatoma cells (HepG2) were obtained from the Biology Investigation Centre Collection (BIC, Madrid, Spain). HL-60 cells were maintained in RPMI 1640 Medium and HepG2 cells were cultured as monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium. The media were supplemented with 10% v/v heat-inactivated fetal calf serum, 50  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin, 50 UI/mL penicillin and 50  $\mu\text{g/mL}$  L-glutamine. Culture medium and supplements required for the growth of the human tumoral cell lines were purchased from GIBCO (Laboratories Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). All human cell cultures were incubated at 37°C and 100% humidity in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. The cells between 8-15 passages were used in the experiments of this work. Controls included a medium control without NPs as a negative control. Etoposide has been extensively studied (Custódio et al., 2002) and was used in this study as a positive control (5 and 100  $\mu\text{M}$  in HepG2 and HL-60 cells, respectively) of apoptosis.

##### *Morphological evaluation of cell death*

To determine the range of concentrations to induce apoptosis we examined the effect of NPs on nucleus chromatin condensation. HepG2 and HL-60 cells ( $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) were exposed with 4.7 nm AgNPs (0.5-

13.45  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), 42 nm AgNPs (25- 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and 30 nm AuNPs (5-15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 24 h. After exposure, the cells were stained with Hoescht 33 342 (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and ethidium bromide (20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 5 min (Jerome and Chen 2000). Following washing out of the dyes, the cells were examined under a UV-visible fluorescence microscope (Axiostar plus microscope, Zeiss).

#### *Annexin V/propidium iodide (PI) assay*

Apoptotic cells were detected using a Vibrant Apoptosis Assay Kit #2 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Based on its affinity for phosphatidylserine (PS), annexin V can be used as a sensitive probe for cell surface exposure of PS, which is translocated from the inner side of the plasma membrane to the external surface of apoptotic cells. Dead cells can be stained by PI, which enters cells with a disrupted plasma membrane and binds DNA (Radakovic et al. 2013). Briefly, after exposure of HL-60 cells with 4.7 nm AgNPs (3.36- 6.72  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), 42 nm AgNPs (150- 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and 30 nm AuNPs (10- 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 17, 24 and 48 h,  $1.5 \times 10^5$  cells were resuspended in 100  $\mu\text{l}$  1X annexin binding buffer and incubated with 5  $\mu\text{l}$  of Alexa Fluor 488 annexin V and 10  $\mu\text{l}$  of PI (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 15 min at room temperature. After the incubation period, the cells were washed with 400  $\mu\text{l}$  of 1X annexin-binding buffer, mixed gently and the samples kept on ice. The cells were analyzed by flow cytometry using a FACS Calibur flow cytometer (Beckton Dickinson) and the CellQuest software. For each experiment  $10^4$  cells were analyzed.

#### *TdT-dUTP terminal nick-end labelling (TUNEL) assay*

Apoptotic cell death was also measured by the In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein according to the manufacturer's protocol (Roche, Indianapolis, USA). HepG2 and HL-60 cells were exposed with 4.7 nm AgNPs (1.68- 3.36  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 3.36- 6.72  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively), 42 nm AgNPs (25- 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 150- 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively) and 30 nm AuNPs (10-15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 48 and 72 h. Briefly,  $3 \times 10^6$  cells were washed with PBS and fixed in 2% formaldehyde in PBS (1 ml) for 1 h at room temperature. Cells were washed with PBS and incubated with permeabilization solution (0.1% triton X-100 in 0.1% sodium citrate) for 2 min on ice. Subsequently, the cells were incubated with the TUNEL reaction mixture [50  $\mu\text{l}$  of enzyme solution (TdT) and 450  $\mu\text{l}$  of label solution (fluoresceindUTP)] for 1 h at 37 °C in the dark in a humidified atmosphere. Omission of TdT from the staining protocol constituted the negative control. After the cells were washed with PBS, the label incorporated into the damaged sites of DNA was detected using a FACS Calibur flow cytometer (Becton and Dickinson) and the CellQuest software. For each experiment  $10^4$  cells were analyzed.

#### *Caspase activation assay*

Activation of caspases was measured by the Vybrant FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit, according to the manufacture's protocol (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). This assay is based on a fluorescent inhibitor of caspases (FLICA) methodology, essentially an affinity label. The FLICA reagent interacts with the enzymatic reactive centre of an activated caspase via the recognition sequence, and then to attach covalently through the fluoromethyl ketone (FMK) moiety. HepG2 and HL-60 cells were exposed with 4.7 nm AgNPs (1.68- 3.36  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 3.36- 6.72  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively), 42 nm AgNPs (25- 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 150- 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively) and 30 nm AuNPs (10-15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 24 h. Briefly,  $3 \times 10^5$  cells were harvested and incubated with 30X FLICA (10  $\mu\text{l}$ ) for 1 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in darkness. Then, cells were washed twice with 1X Buffer, stained with PI (2  $\mu\text{L}$ ) and immediately analyzed on a FACS Calibur flow cytometer (Becton and Dickinson) and the CellQuest software. For each experiment  $10^4$  cells were analyzed.

#### *Statistical analyses*

All means were calculated from three independent experiments and are expressed in the graphs as the mean and standard deviation (SD). The Student's t-test was used for statistical comparison and differences were considered significant at  $P \leq 0.01$ . Descriptive and graphical methods were used to characterize the data. All tests were performed with the software package Statgraphics Plus 5.0.

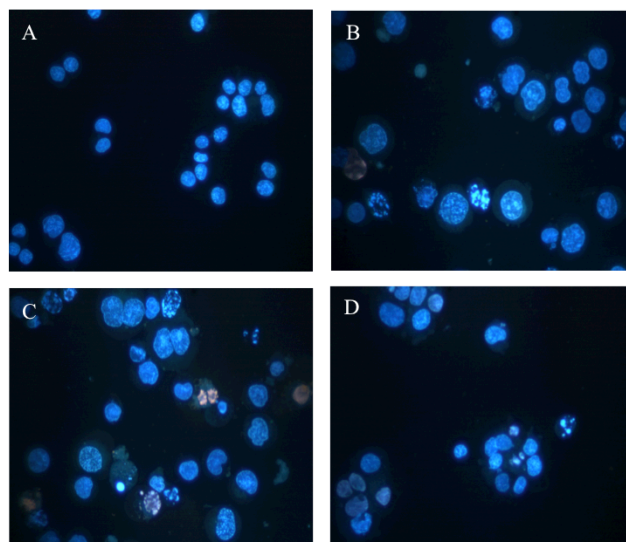
## Results

#### *Analysis of morphological changes induced by AgNPs and AuNPs*

Figure 1 shows morphological changes of nuclear chromatin in HepG2 and HL-60 cells treated with AgNPs and AuNPs. After exposure with 1.68-3.36  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 3.36-6.72  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of 4.7 nm AgNPs more than 30% of cells showed significant nuclear chromatin condensation and fragmentation, in HepG2 and HL-60 cells, respectively (Figure 1B). More than 30 % of apoptotic HepG2 and HL-60 cells were observed with the concentrations of 25-50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 150-200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  42 nm AgNPs, respectively (Figure 1C). Finally, 30 nm AuNPs induced a percentage of apoptotic HepG2 and HL-60 cells around 30% after exposure with 10-15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Figure 1D).

#### *Annexin V/PI assay*

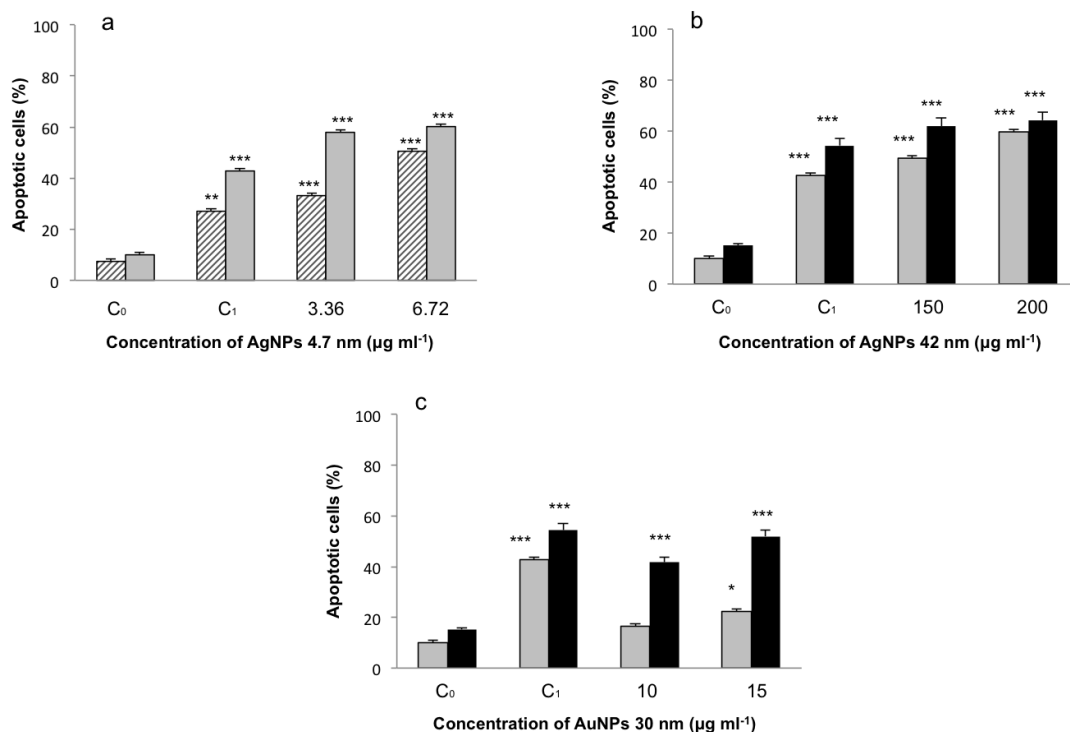
The Annexin V/PI assay was only employed in HL-60 cells, since the various exposures used for the detachment of adherent cells generally interfere with the binding of Annexin V to membrane PS, making apoptosis measurement a technical problem (Zamai et al. 2001). The results are expressed as a percentage of apoptotic cells (Annexin V- positive and PI- negative) over the total cells.



**Figure 1.** Morphological changes of nuclear chromatin in HepG2 (A and D) and HL-60 (B and C) cells treated with AgNPs and AuNPs. Cells were plated in the absence (A) or the presence of 3.36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of 4.7 nm AgNPs (B), 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of 42 nm AgNPs (C) and 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of 30 nm AuNPs (D) for 24 hours.

The three NPs caused a significant increase in the percentage of apoptotic cells in a concentration and time dependent-manner compared with untreated cells (Figure 2). As shown in Figure 2A, 50.4% of apoptotic cells were detected after 17 h exposure with 4.7 nm AgNPs (6.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). However, after 24 h of exposure with 3.36 and 6.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the percentage of apoptotic cells increased to 57.8% and 60.1%,

respectively. With the exposure of 42 nm AgNPs a marked percentage of apoptotic cells was observed after 24 and 48 h with 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (49.3-59.6%) and 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (62.1-64.4%) (Figure 2B). Finally, according to Figure 2C, after exposure with 30 nm AuNPs, the number of the apoptotic cells was apparent at 48 h incubation with 10 and 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (41.7% and 51.9%, respectively).



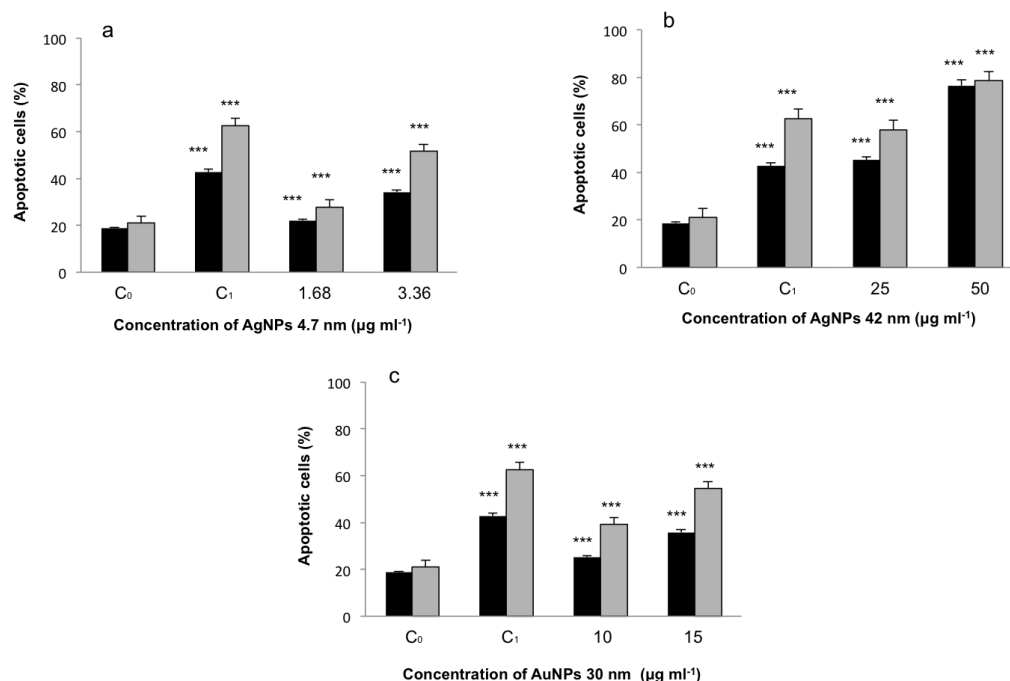
**Figure 2.** Flow cytometric analysis using annexin V/PI assay of HL-60 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 17 (▨), 24 (□) and 48 (■) h. C<sub>0</sub> untreated cells with a percentage of apoptosis after 17, 24 and 48 h of 7.3%, 10% and 15.2%, respectively. C<sub>1</sub>, cells exposed with etoposide (5  $\mu\text{M}$ ) with a percentage of apoptotic cells of 27.1%, 42.7% and 54.4% after 17, 24 and 48 h, respectively. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*  $p \leq 0.05$ .

### TUNEL assay

The TUNEL assay is commonly used to detect DNA fragmentation, which is a hallmark of the late stages of apoptosis (Kyrylkova et al. 2012). The results are expressed as a percentage of apoptotic cells over the total cells.

TUNEL analysis showed that the three NPs induced apoptosis in a concentration and time dependent-manner in HepG2 and HL-60 cells (Figure 3 and 4). The exposure with the lowest concentration of 4.7 nm AgNPs ( $1.68 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) induced 27.8% of apoptotic

HepG2 cells at 72 h, whereas a markedly higher percentage of apoptotic cells (51.6%) was noted at  $3.36 \mu\text{g ml}^{-1}$  (Figure 3A). Apoptosis was clearly evident in HepG2 cells exposed with  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  of 42 nm AgNPs for 48 and 72 h, since more than 76% of cells were apoptotic cells (Figure 3B). Finally, as shown in Figure 3C, the exposure with 30 nm AuNPs was also able to increase significantly the percentage of apoptotic cells at all tested concentration (10 and  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 48 (25.1% and 36.8%, respectively) and 72 h (39.1% and 54.5%, respectively).



**Figure 3.** Flow cytometric analysis using TUNEL assay of HepG2 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 48 (■) and 72 (□) h. C<sub>0</sub> untreated cells with a percentage of apoptosis after 48 and 72 h of 18.7% and 21.1%, respectively. C<sub>1</sub>, cells exposed with etoposide (100  $\mu\text{M}$ ) with a percentage of apoptotic cells of 42.7% and 62.6% after 48 and 72 h, respectively. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

As shown in Figure 4A, the lowest concentration of 4.7 nm AgNPs ( $3.36 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) did not induce a marked percentage of apoptotic HL-60 cells after 48 h of incubation (18%). However, the percentage of apoptotic cells was much more higher after 72 h of exposure with  $3.36$  and  $6.72 \mu\text{g ml}^{-1}$  (63.9% and 76.2%, respectively). With the exposure of 42 nm AgNPs ( $150$  and  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) the percentage of apoptotic cells did not exceed 38% after 48 and 72 h (Figure 4B). Finally, HL-60 cells presented a moderate but significant increase of apoptotic cells after exposure with  $10$  and  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  of 30 nm AuNPs for 48 (24.8% and 32.3%, respectively) and 72 h (32.7% and 51.5%, respectively) (Figure 4C).

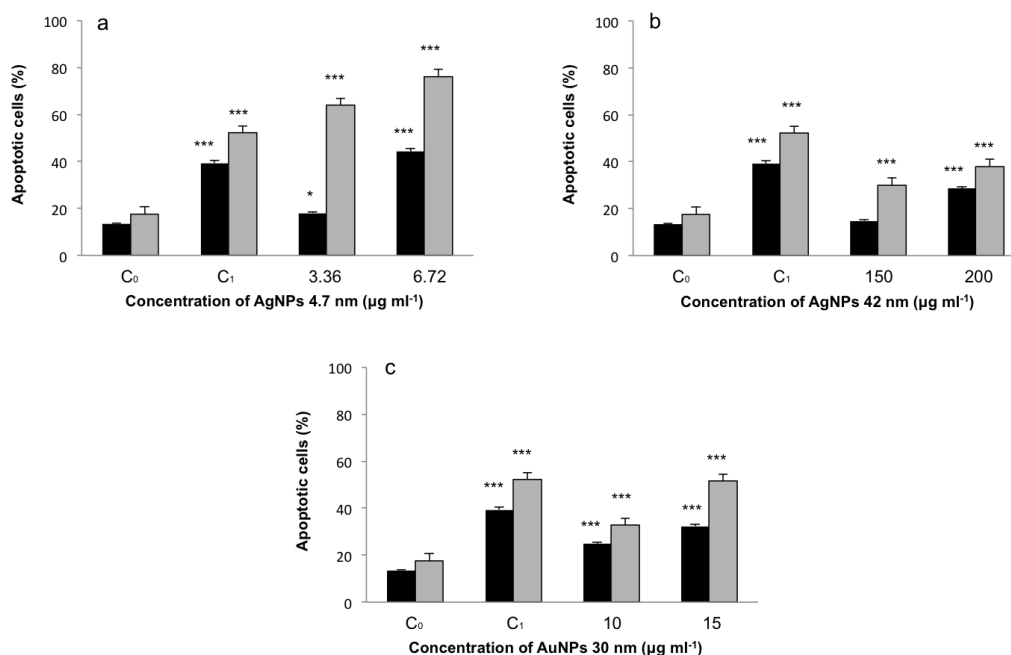
### Caspase activation assay

Caspases-3 and 7 are crucial for apoptosis, since the apoptotic signal is based on activation of Caspase-3/7, a primary and irreversible executioner pathway in

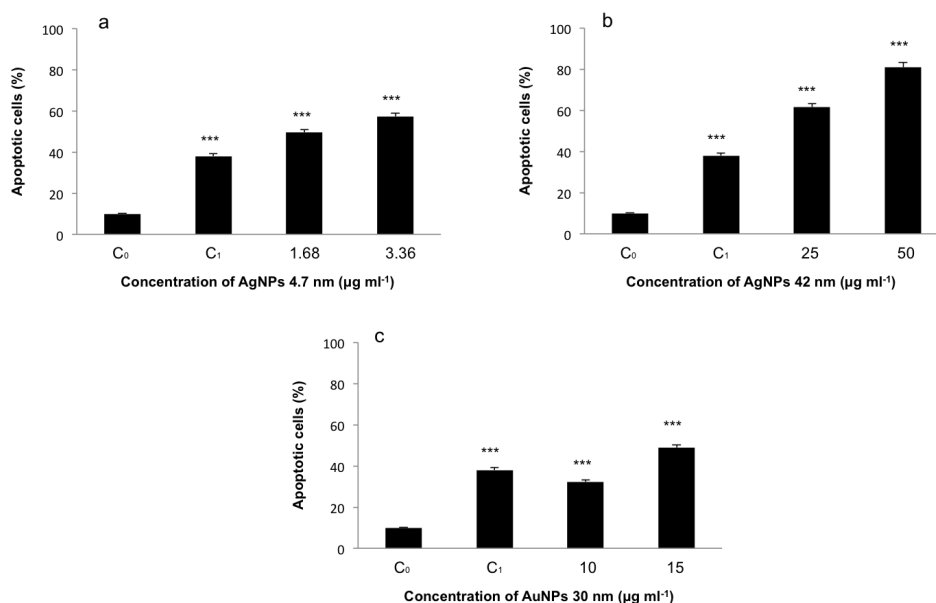
most cell types (Lakhani et al. 2006). The cells with active caspases 3 and 7 are considered apoptotic cells. The results are expressed as a percentage of apoptotic cells (FLICA- positive and PI- negative) over the total cells.

The exposure with 4.7 nm AgNPs increased significantly the percentage of apoptotic HepG2 cells at all concentrations tested,  $1.68$  and  $3.36 \mu\text{g ml}^{-1}$  (49.4% and 57.1%, respectively) (Figure 5A). 42 nm AgNPs at both low ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and high ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) concentrations also caused a significant increase in apoptosis with 61.4% and 80.9% of cells being apoptotic, respectively (Figure 5B). Finally, as shown in Figure 5C, HepG2 cells presented a moderate increase of apoptotic cells after exposure with  $10$  and  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  of 30 nm AuNPs (32.3% and 48.9%, respectively).





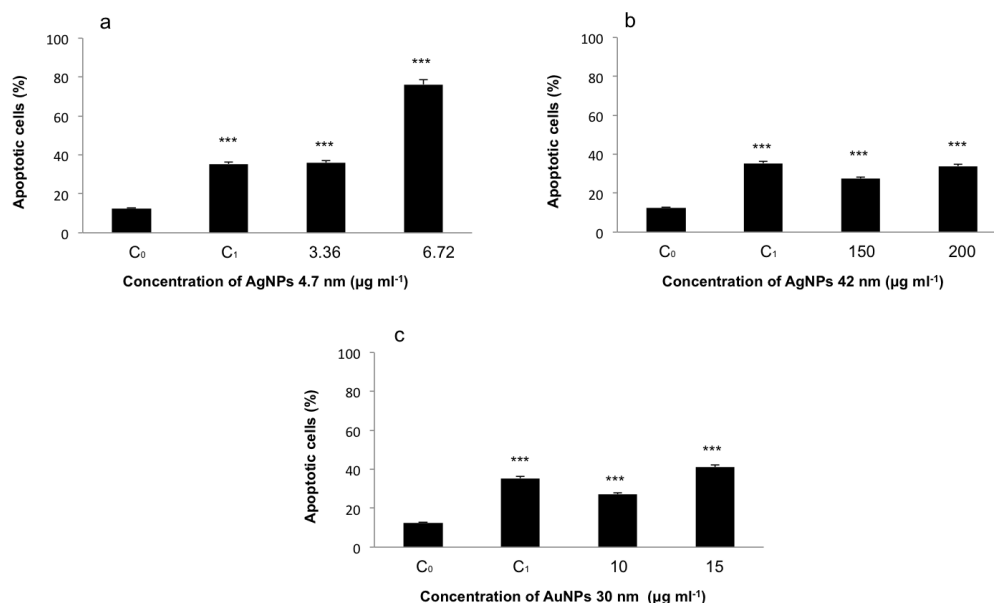
**Figure 4.** Flow cytometric analysis using TUNEL assay of HL-60 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 48 (■) and 72 (□) h.  $C_0$  untreated cells with a percentage of apoptosis after 48 and 72 h of 13.5% and 17.7%, respectively.  $C_1$ , cells exposed with etoposide (5  $\mu\text{M}$ ) with a percentage of apoptotic cells of 39.3% and 52.1% after 48 and 72 h, respectively. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$  and \*  $p \leq 0.05$ .



**Figure 5.** Flow cytometric analysis using caspase activation assay of HepG2 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 24 h.  $C_0$  untreated cells with a 10% of apoptosis.  $C_1$ , cells exposed with etoposide (100  $\mu\text{M}$ ) with a 38% of apoptosis. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

A significant increase of apoptotic HL-60 cells was observed after exposure with 4.7 nm AgNPs (3.36 and 6.72  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). The maximum apoptosis was induced after 6.72  $\mu\text{g ml}^{-1}$  exposure as 76.2% of cells were classified as apoptotic (Figure 6A). As shown in Figure 6B, both concentrations of 42 nm AgNPs (150

and 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) induced a marked percentage of apoptotic cells (27.6% and 33.9%, respectively). Finally, the exposure with 10 and 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of 30 nm AuNPs was also able to increase in a similar manner the percentage of apoptotic cells (27% and 41.1%, respectively) (Figure 6C).



**Figure 6.** Flow cytometric analysis using caspase activation assay of HL-60 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 24 h. C<sub>0</sub> untreated cells with a 12.6% of apoptosis. C<sub>1</sub>, cells exposed with etoposide (5  $\mu$ M) with a 35.4% of apoptosis. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### Discussion

Although the beneficial effects of AgNPs and AuNPs have attracted considerable attention in terms of environmental hazards should also be taken into account. EFSA suggests that the assessment of the potential risk of the NPs should be done case by case individually, taking into account the nanomaterial and their physico-chemical characteristics as the size (EFSA, 2011), hence the importance of studying each NPs separately. A safety evaluation of NPs requires an understanding of their chemical properties, including size, size distribution, shape and other physicochemical properties (Powers et al. 2006), so an initial characterization of the test substance is imperative before any toxicity screening is commenced. Previously, our research group has reported the characterization of NPs employed in this study (Ávalos et al. 2014, Mateo et al. 2014). Moreover, we have demonstrated that AgNPs and AuNPs increased the ROS production and induced different levels of oxidative DNA damage in HepG2 and HL-60 cells (Ávalos et al. 2014, Mateo et al. 2014, Ávalos et al. 2015b). Specifically, due to the connection between oxidative stress and apoptosis, in the present work we have investigated the induction of apoptosis by AgNPs and AuNPs in HepG2 and HL-60 cells.

AgNPs and AuNPs induced apoptosis in HepG2 and HL-60 cells in a concentration and time dependent-manner, as observed by flow cytometry. PS externalization in HL-60 cells was first observed with 4.7 nm AgNPs exposure (17 h). After 24 and 48 h of exposure the PS externalization was observed with all NPs evaluated (Figure 2). In contrast, DNA strand

nanomedicine (Chen and Schluesener 2008, Aliev et al. 2009, Barreto et al. 2011), potential biological and

breaks as detected by TUNEL assay in HepG2 and HL-60 cells were found after 48-72 h of incubation with the three NPs (Figure 3). It is generally accepted that the appearance of PS on the outside of the plasma membrane is an early sign of apoptosis, occurring prior to the detection of DNA strand breaks in many cell types after different exposures (García et al. 2008).

These results are overall in agreement with several recent reports using different assays describing interference with DNA regulation after AuNPs and AgNPs exposure (Kim and Ryu 2013). The level of annexin V staining increased after AgNPs (5-10 nm) and AuNPs (10-40 nm) exposure in human Jurkat T cells and African green monkey kidney cells, respectively (Eom and Choi 2010, Chueh et al. 2014). Moreover, Söderstjerna et al. (2014) observed that the exposure with AgNPs (20 and 80 nm) and AuNPs (20 and 80 nm) in outer neuronal layers of the retina significantly increased TUNEL- positive cells.

To determine whether the caspases were involved in AgNPs and AuNPs induced cell death, we also detected active caspases-3 and -7 employing a fluorescent inhibitor. A significant increase in the percentage of cells with active caspases-3 and -7 were observed after exposure with the three NPs during 24 h in both cell lines (Figure 5 and 6). The activation of caspase-3 was detected in AgNPs and AuNPs-exposed human and animal cells. Arora et al. (2008, 2009) observed an increase in activity of caspase-3

after 24 h of exposure with AgNPs (7-20 nm) in human skin carcinoma, human fibrosarcoma and primary mouse fibroblast and liver cells. Moreover, the exposure with AuNPs (1.5 nm) and AgNPs (5-10 nm) increased the expression of caspase 3 in human keratinocyte cells and human chang liver cells, respectively (Schaeublin et al. 2011, Piao et al. 2011).

Comparing the three NPs, 4.7 nm AgNPs was the most effective NPs to induce apoptosis in HepG2 and HL-60 cells. Kumar et al. (2015) studied the apoptotic effect of 10, 100 and 200 nm AgNPs in L-929 fibroblast cells using 7-AAD and Annexin V. Apoptosis in AgNP-exposed fibroblast depends on AgNPs size, since the smallest (10 nm) AgNPs were significantly more toxic than larger-sizes particles. Kim et al. (2012) also observed that the smallest AgNPs (10 nm) had a greater ability to induce apoptosis in mouse preosteoblast MC3T3-E1 cells than the other sized (50 and 100 nm) by Annexin V/PI assay. Therefore, the size of NPs appears to be extremely relevant to their toxicity. In our previous studies the smaller NPs (4.7 nm AgNPs) was also the most cytotoxic and genotoxic (Ávalos et al. 2014, Ávalos et al. 2015b). Several attributes of smaller-size NPs may contribute to their enhanced toxicity (Haase et al. 2011, Pan et al. 2007). It is recognized that smaller NPs are able to penetrate to mammalian cell membrane more efficiently than larger NPs. Once they are internalized, smaller NPs also have a larger surface area available for interaction with cellular organelles (Liu et al. 2010).

Furthermore, the higher sensitivity of HepG2 cells to AgNPs (4.7 and 42 nm) than HL-60 cells. A possible explanation of this variation could be attributed to the differences in the levels of enzymatic activities in HepG2 and HL-60 cells (García et al. 2009). Moreover, living cells have nuclear pore complexes (NPCs) in nuclear envelop, and the diameter of NPCs is largely 20-50 nm, which varies depending on cell type (Wente 2000). Small neutral particles (diameter 5 nm) can diffuse unaided across the NPC, while many small macromolecules will generally only be transported efficiently if they display a particular transport signal sequence, such as a nuclear localization signal (NLS) or nuclear export signal (NES) (Feldherr and Akin, 1997). NPCs can pass cargoes up to 30 nm diameter, at rates as high as several hundred macromolecules per second—each transport factor– cargo complex dwelling in the NPC for a time on the order of 10 ms (Kubitscheck et al., 2005; Yang et al., 2004).

However, with the 30 nm AuNPs exposure we did not observe significant difference between both cell lines. Therefore, this different behaviour between metallic NPs could be explained because NPs of different chemical compositions and properties follow different uptake pathways and employ different mechanisms

toward their final biological responses (Hsiao and Huang 2011).

In terms of mechanisms of toxicity, we have previously demonstrated that one of the main mechanisms of AgNPs (4.7 and 42 nm) and AuNPs (30 nm) toxicity seems to be mediated by an increase in ROS production (Ávalos et al. 2014, Mateo et al. 2014). Several reports indicated oxidative stress to be involved directly in DNA damage and apoptosis (Gopinath et al. 2010). Among the different apoptotic pathways, the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway would play a major role in metal oxide NP-induce cell death since mitochondria are one of the major target organelles for NP-induced oxidative stress (Manke et al. 2013). Accordingly, Hsin et al. (2008) and Selim and Hendi (2012) observed that the exposure with AgNPs and AuNPs stimulated the release of cytochrome c into the cytosol and the translocation of Bax into the mitochondria in NIHT3T3 and MCF-7 cells, indicating that the AgNPs and AuNPs activated a mitochondria-dependent apoptotic pathway. Release of cytochrome c is a critical to caspase activation (Higuchi et al. 2003). Therefore, the mitochondrial apoptotic pathway might be involved in the HepG2 and HL-60 cells apoptosis after exposure with AgNPs (4.7 and 42 nm) and AuNPs (30 nm).

#### Conclusion

The present study shows that 4.7 and 42 nm AgNPs and 30 nm AuNPs induce apoptosis time and concentration-dependent in HepG2 and HL-60 cells via a pathway that involves caspases. Moreover, AgNPs induced apoptosis size-dependent in both cell lines, being the smallest one (4.7 nm) the most effective to induce apoptosis. Our findings can help to know better the mechanisms of toxicity of the AgNPs and AuNPs. Thus, the commercial application of AgNPs and AuNPs should be more carefully and thoroughly assessed as to their potential toxic effects to the environment and humans.

#### Acknowledgments

This work has been supported by Grant AGL2010-16561 from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). A. Ávalos is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### References

- Aliev, G., Daza, J., Lipsitt, A., Martinez-Agüero, M., Palacios, H.H., Fischbach, K., Obrenovich, M.E., LaManna, J.C., Bragin, V. and Morales, L., 2009. Silver nanoparticle as alternate strategies for drug delivery to Alzheimer brain. *Alzheimer Dement* 5 (1), 324.

- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M. and Paknikar, K.M., 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett.* 179, 93-100.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M. and Paknikar, K.M., 2009. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 310-318.
- Ávalos, A., Haza, A.I., Mateo, D. and Morales, P., 2014. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *J. Appl. Toxicol.* 34, 413-423.
- Ávalos, A., Haza, A.I., Mateo, D. and Morales, P., 2015a. Effect of silver and gold nanoparticles of different sizes in human pulmonary fibroblasts. *Toxicol. Mech. Methods* 25 (4), 287-295.
- Ávalos, A., Haza, A.I. and Morales, P., 2015b. Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts. *Folia Biologica Prague* 61, 33-42.
- Barreto, J.A., O'Malley, W., Kubeil, M., Graham, B., Stephan, H. and Spiccia, L., 2011. Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. *Adv. Mater.* 23 (12), H18-40.
- Chen, X. and Schluesener, H.J., 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* 176, 1-12.
- Choi, C.H.J., Alabi, C.A., Webster, P. and Davis, M.E., 2010. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 1235-1240.
- Chuang, S.M., Lee, Y.H., Liang, R.Y., Roam, G.D., Zeng, Z.M., Tu, H.F., Wang, S.K. and Chueh, P.J., 2013. Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4960-4973.
- Chueh, P.J., Liang, R.Y., Lee, Y.H., Zeng, Z.M. and Chuang, S.M., 2014. Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *J. Hazard Mater.* 264, 303-312.
- Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J. and Wyatt, M.D., 2005. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1, 325-327.
- Custodio, J.B., Cordoso, C.M. and Almeida, L.M., 2002. Thiol protecting agents and antioxidants inhibit the mitochondrial permeability transition promoted by etoposide: implications in the prevention of etoposide induced apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 140, 169-184.
- Dhawan, A. and Sharma, V., 2010. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 589-605.
- Di Guglielmo, C., De Lapuente, J., Porredon, C., Ramos-López, D., Sendra, J. and Borrás, M., 2012. In vitro safety toxicology data for evaluation of gold nanoparticles-chronic cytotoxicity, genotoxicity and uptake. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12 (8), 6185-6191.
- Dreher, K.L., 2004. Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 77, 3-5.
- EFSA Scientific Committee, 2011. Scientific Opinion. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal*, 9 (5), 2140.
- Eom, H.J. and Choi, J., 2010. P38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8337-8342.
- Feldherr, C.M. and Akin, D., 1997. The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *J. Cell. Sci.* 110, 3065-3070.
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D.A., Hoffmann, H.J. and Autrup, H., 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* 190, 156-162.
- Franco, R., Sanchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M. and Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat. Res.* 674 (1-2), 3-22.
- Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O. and Samali, S., 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 1-23.
- García, A., Morales, P., Arranz, N., Delgado, E., Rafter, J. and Haza, A.I., 2008. Induction of apoptosis and reactive oxygen species production by N-nitrosopiperidine and N-nitrosodibutylamine in human leukemia cells. *J. Appl. Toxicol.* 28, 455-465.
- García, A., Morales, P., Arranz, N., Delgado, E., Rafter, J. and Haza, A.I., 2009. Antiapoptotic effects of dietary antioxidants towards N-nitrosopiperidine and N-nitrosodibutylamine- induced apoptosis in HL-60 and HepG2 cells. *J. Appl. Toxicol.* 29, 403-413.
- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T. and Rotello, V., 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* 15, 897-900.
- Gopinath, P., Kumar, S., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A. and Ghosh, S.S., 2010. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 77, 240-245.
- Haase, A., Arlinghaus, H.F., Tentschert, J., Jungnickel, H., Graf, P., Mantion, A., Draude, F., Galla, S., Plendl, J., Goetz, M.E., Masic, A., Meier, W., Thunemann, A.F., Taubert, A. and Luch, A., 2011. Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: Visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses. *ACS Nano* 5, 3059-3068.

- Higuchi, Y., 2003. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1527–1535.
- Hsiao, I.L. and Huang, Y.J., 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci. Total Environ.* 409, 1219–1228.
- Hsin, Y.H., Chen, C.F., Huang, S., Shih, T.S., Lai, P.S. and Chueh, P.J., 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 179, 130–139.
- Iavicoli, I., Calabrese, E.J. and Nascarella, M.A., 2010. Exposure to nanoparticles and hormesis. *Dose Response* 8 (4), 501–17.
- Jerome, K.R. and Chen, Z., 2000. Apoptosis in HL-60 cells and topoisomerase I in vivo. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124, 802–805.
- Johnston, H.J., Hutchison, G., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S. and Stone, V., 2010. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 328–346.
- Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K., Park, K., Yi, J. and Ryu, D., 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro* 23, 1076–1084.
- Kim, S. and Ryu, D.Y., 2013. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *J. Appl. Toxicol.* 33 (2), 78–89.
- Kim, T.H., Kim, M., Park, H.S., Shin, U.S., Gong, M.S. and Kim, H.W., 2012. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100 (4), 1033–43.
- Krampe, B. and Al-Rubeai, M., 2010. Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology* 62, 175–188.
- Kubitscheck, U., Grünwald, D., Hoekstra, A., Rohleder, D., Kues, T., Siebrasse, J.P. and Peters, R., 2005. Nuclear transport of single molecules: Dwell times at the nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.* 168, 233–243.
- Kumar, G., Degheidy, H., Casey, B.J. and Goering, P.L., 2015. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.* 85, 45–51.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. and Kioussi, C., 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol. Biol.* 887, 41–7.
- Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A., Jr Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I. and Flavell, R.A., 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311 (5762), 847–51.
- Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H.C., Wang, T., Liao, C.Y., Cui, L., Zhou, Q.F., Yan, B. and Jiang, G.B., 2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* 4, 319–330.
- Lowe, S.W. and Lin, A.W., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21 (3), 485–495.
- Manke, A., Wang, L. and Rojanasakul, Y., 2013. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed. Res. Int.* 2013 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/942916>
- Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A. and Haza, A.I., 2014. Oxidative stress contributes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Toxicol. Mech. Methods* 24 (3), 161–172.
- Maynard, A.D., Aitken, R.J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdorster, G., Philbert, M.A., Ryan, J., Seaton, A., Stone, V., Tinkle, S.S., Walker, N.J. and Warheit, D.B., 2006. Safe handling in nanotechnology. *Nature* 444, 267–269.
- Miao, E.A., Rajan, J.V. and Aderem, A., 2011. Caspase-1 induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* 243 (1), 206–214.
- Morgan, A.B., Chu, L.L. and Harris, J.D., 2005. A flammability performance comparison between synthetic and natural clays in polystyrene nanocomposites. *Fire Mater.* 29, 213–229.
- Nandedkar, T.D., 2009. Nanovaccines: recent developments in vaccination. *J. Biosci.* 34, 995–1003.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. and Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Paino, I.M., Marangoni, V.S., de Oliveira, R.C., Antunes, L.M. and Zucolotto, V., 2012. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Lett.* 215, 119–25.
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W. and Jahn-Dechent, W., 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3, 1941–1949.
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U. and Jahn-Dechent, W., 2009. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5, 2067–2076.
- Pereira, W.O. and Amarante-Mendes, G.P., 2011. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal?. *Scand. J. Immunol.* 73, 401–407.
- Piao, M.J., Kang, K.A., Lee, I.K., Kim, H.S., Kim, S., Choi, J.Y., Choi, J. and Hyun, J.W., 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol. Lett.* 201, 92–100.

- Powers, K.W., Brown, S.C., Krishna, V.B., Wasdo, S.C., Moudgil, B.M. and Roberts, S.M., 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol. Sci.* 90 (2), 296–303.
- Radakovic, M., Stevanovic, J., Djelic, N., Lakic, N., Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B. and Stanimirovic, Z., 2013. Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay. *J Biosci.* 38, 53-62.
- Robertson, J.D. and Orrenius, S., 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 609–627.
- Sanchez, F. and Sobolev, K., 2010. Nanotechnology in concrete-A review. *Construction and Building Materials* 24, 2060-2071.
- Sanpui, P., Chattopadhyay, A. and Ghosh, S.S., 2011. Induction of Apoptosis in Cancer Cells at Low Silver Nanoparticle Concentrations using Chitosan Nanocarrier. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3 (2), 218-228.
- Schaeublin, N.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Miller, J.M., Hutchison, J., Schlager, J.J. and Hussain, S.M., 2011. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3 (2), 410-420.
- Schmid G. (ed) 2004. Nanoparticles. From theory to application. Wiley-VCH, Weinheim.
- Selim, M.E. and Hendi, A.A., 2012. Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13,1617-20.
- Sintubin, L., Verstraete, W. and Boon, N., 2012. Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 2422-2436.
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R. and Sastry, M., 2005. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir* 21, 10644–10654.
- Söderstjerna, E., Bauer, P., Cedervall, T., Abdshill, H., Johansson, F. and Johansson, U.E., 2014. Silver and gold nanoparticles exposure to in vitro cultured retina- studies on nanoparticle internalization, apoptosis, oxidative stress, glial- and microglial activity. *Plos one* 9 (8), e105359.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. and Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Review Mol. Cell Biol.* 9, 231-241.
- Ulukaya, E., Acilan, C. and Yilmaz, Y., 2011. Apoptosis: why and how does it occur in biology?. *Cell Biochem. Funct.* 29, 468-480.
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D. and Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769-1780.
- Wente, S.R., 2000. Gatekeepers of the nucleus. *Science* 288, 1374–1377.
- Yang, W., Gelles, J. and Musser, S.M., 2004. Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 12887–12892.
- Yoon, K.Y., Byeon, J.H., Park, J.H. and Hwang, J., 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 373, 572-575.
- Zamai, L., Canonico, B., Luchetti, F., Ferri, P., Melloni, E., Guidotti, L., Cappellini, A., Cutroneo, G., Vitale, M. and Papa, S., 2001. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherente cells. *Cytometry* 44, 57-64.
- Zang, X., Chen, F. and Huang, Z., 2009. Apoptosis induced by acrylamide is suppressed in a 21.5% fat diet through caspase-3-independent pathway in mice testis. *Toxicol. Mech. Methods* 19 (3), 219-224.



## CAPÍTULO V

### *Discusión integradora*





## V.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

El aumento del uso e interés de las NPs ha dado lugar a una enorme cantidad de NPs con diferentes composiciones y propiedades físico-químicas. Estas propiedades únicas no sólo determinan su utilidad para sus aplicaciones, sino también su toxicidad.

Las propiedades físico-químicas de las NPs juegan un papel significativo en los efectos sobre los sistemas biológicos (Donaldson y col., 2004; Oberdörster y col., 2000). Por tanto, la caracterización de las NPs es de suma importancia con el fin de establecer una correlación entre propiedades físico-químicas/ actividad biológica (Warheit, 2008). Oberdörster y col. (2005) propusieron una lista con las características físico-químicas que podrían ser importantes para comprender la actividad biológica y las propiedades tóxicas de las NPs. El tamaño de la partícula y la distribución de tamaño, el estado de aglomeración, la morfología, la estructura cristalina, la composición química, la carga superficial y la porosidad se sugirieron como características principales.

En el presente trabajo de investigación estudiamos algunas de las características más importantes de las AgNPs mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y la dispersión de luz dinámica (DLS). La MET se basa en la irradiación de una muestra con un haz de electrones acelerados. Estos electrones son generados en el cañón del microscopio a través de un sistema de lentes electromagnéticas (condensadoras) y se aceleran por una diferencia de potencial en condiciones de vacío para evitar la interacción con el aire. El haz creado, se dirige hacia la muestra a través de otro sistema de lentes electromagnéticas objetivo y tras la interacción, el haz que contiene los electrones que atraviesan la muestra (transmitidos) es aumentado y proyectado por las lentes proyectoras. Esta técnica permite determinar el tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las partículas. Los resultados obtenidos del tamaño de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en solución acuosa coinciden con la información suministrada ( $5.5 \pm 2.77$  nm y  $41.06 \pm 9.29$  nm, respectivamente) (**Tabla 1, artículo 2**), sin embargo con las AgNPs de 157 nm el tamaño observado fue menor al dado por el fabricante ( $93.5 \pm 12.1$  nm) (**Figura 1 A, artículo 1**). Con las AgNPs de 4.7 nm observamos un rango de tamaño de NPs que iba desde 2.63 nm a 20 nm, con las AgNPs de 42 nm el rango de tamaños fue de 25 nm a 61.76 nm y finalmente las AgNPs de 157 nm presentaron una distribución de tamaños de 30 nm a 123 nm, por lo tanto, las tres AgNPs evaluadas son polidispersas, es decir presentan una gran variabilidad los tamaños de las NPs.

Aunque no existe ninguna definición de NMs mundialmente aceptada, el punto focal en las definiciones existentes es el rango de tamaño, por lo tanto, el tamaño puede ser reconocido como el parámetro más importante para los NMs en general. Desde el punto de vista toxicológico, existe una relación inversa entre tamaño y toxicidad.

El tamaño de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en solución acuosa también fue evaluado por el DLS. Mediante esta técnica se puede determinar el diámetro hidrodinámico de un material en suspensión por medio de medidas del movimiento browniano de las partículas. Cuando se tienen partículas en solución, éstas se desplazan de manera aleatoria como consecuencia de los choques con el medio en el que están inmersas (movimiento browniano). Al hacer incidir un haz de luz sobre estas partículas es dispersado y su intensidad varía con el tiempo debido al movimiento browniano. Utilizando varios algoritmos matemáticos se puede relacionar esta variación en la intensidad con el tamaño hidrodinámico de las partículas. Las AgNPs de 4.7 y 42 nm presentaron un tamaño superior al obtenido con la MET ( $10.48 \pm 4.27$  nm y  $83.08 \pm 15.08$  nm, respectivamente). Estas diferencias obtenidas se deben a que el DLS mide la muestra en el estado acuoso donde habrá moléculas de disolvente asociadas con las NPs, mientras que el MET mide las NPs en estado seco (Domingos y col., 2009).

Se ha observado que la aglomeración de las NPs en medio de cultivo puede tener un importante impacto en su toxicidad *in vitro* (Liu y col., 2009). La aglomeración se sabe que ocurre en la mayoría de las NPs manufacturadas con alta actividad superficial (Skebo y col., 2007). Por ello, el tamaño de nuestras AgNPs incubadas en los diferentes medios de cultivo empleados en nuestro estudio fue evaluado por MET y DLS. Cuando las AgNPs de 4.7 y 42 nm se incubaron en medio de cultivo, observamos, tanto por MET como por DLS (**Figura 1B, 1D y 2B, 2D, artículo 2; Figura 1 artículo 3**), la formación de aglomerados, indicando la posible interacción de las AgNPs con el medio (AgNPs 4.7 nm:  $106.2 \pm 6.5$  nm en HepG2,  $101 \pm 2.4$  nm en HL60 y  $138.9 \pm 4.9$  nm en fibroblastos; AgNPs 42 nm:  $126.5 \pm 6$  nm en HepG2,  $102.3 \pm 9.4$  nm en HL60 y  $259.9 \pm 12.3$  nm en fibroblastos) (**Tabla 2, artículo 2**). Este hecho ha sido ampliamente publicado con diferentes NPs que conducen a la formación de “proteínas corona” (Lynch y Dawson, 2008; Lundqvist y col., 2008). Sin embargo, el análisis por DLS de las AgNPs de 157 nm tras ser incubadas en medio de cultivo, mostró que el tamaño de estas aumentó solo ligeramente (191- 216 nm) (**Figura 1 B, artículo 1**).

Cuando las NPs entran en contacto con un fluido biológico, proteínas y/o enzimas pueden adherirse a su superficie, creando proteínas corona. Estas proteínas corona tienen un gran impacto en las propiedades superficiales de las NPs, ya que puede cambiar completamente la carga total (potencial zeta), las propiedades de agregación y el diámetro hidrodinámico de las NPs. Además, las proteínas adheridas pueden sufrir cambios conformacionales que afectan a su avidéz, a los epítomos expuestos y a su funcionalidad (Lundqvist y col., 2008; Cedervall y col., 2007; Linse y col., 2007). Por lo tanto, no sólo el tamaño primario de las NPs (el de fábrica) sino también el tamaño secundario de las NPs se podría usar como un parámetro característico para determinar la toxicidad *in vitro* de NPs en un medio de cultivo celular (Kato, 2011).

Otra de las principales características de las NPs es la morfología. Se ha comprobado que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y por tanto son más reactivas (Pal y col., 2007). Las formas esféricas son las que presentan menor toxicidad. Nuestros resultados mostraron que la mayoría de las AgNPs de 4.7 y 42 nm observadas por MET fueron esféricas, de múltiples facetas, siendo algunas de ellas ligeramente alargadas (**Figura 1A, 1C y 2A, 2C, artículo 2**), mientras que las AgNPs de 157 nm presentaron una morfología más ovalada (**Figura 1 A, artículo 1**).

## V.2. CITOTOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Una adecuada selección de los ensayos de citotoxicidad es vital para una evaluación precisa de la toxicidad de las AgNPs. La EFSA en 2011 publicó la “Guía para evaluar el riesgo de la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología en los alimentos y en la cadena alimentaria”, que recomienda realizar al menos dos pruebas para estudiar la citotoxicidad de los NMs *in vitro*, sugiriendo ensayos para evaluar la integridad de la membrana (liberación de la LDH) y la actividad mitocondrial (reducción del MTT) (EFSA Comité Científico, 2011a). En el presente trabajo de investigación evaluamos el efecto de tres AgNPs de diferentes tamaños (4.7, 42 y 157 nm) en la viabilidad de las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF, utilizando los métodos MTT y LDH.

El efecto tóxico de las NPs es altamente dependiente de los órganos y específicamente del tipo de célula (Kong y col., 2011). Por lo tanto, la selección del tipo apropiado de célula es un factor importante en los ensayos de citotoxicidad. Con el fin de identificar el efecto de

las AgNPs en los órganos o células de interés, los ensayos de citotoxicidad deben incluir células que representen la vía de exposición u órganos diana de estas. Las principales rutas de exposición humana de las AgNPs son la administración oral, el contacto dérmico, la inhalación y la inyección intravenosa. Por esta razón, en el presente estudio se emplearon las células humanas HepG2, HL-60, NHDF y HPF. Las células de hepatoma humano (HepG2) se utilizaron debido a que numerosos estudios han observado que tras la exposición a las AgNPs el hígado es el principal órgano de acumulación (Johnston y col., 2010). Las células de leucemia (HL-60) se utilizaron para investigar el efecto de las AgNPs en células sanguíneas, importante en el caso de aplicaciones biomédicas. Los fibroblastos de piel (NHDF) y pulmón (HPF) se usaron para determinar la implicación de la exposición cutánea de las AgNPs (debido a la explotación de estas NPs en apósitos para heridas) y para evaluar la respuesta de las células epiteliales que recubren las vías respiratorias o alvéolos (debido a su papel destacado en la eliminación de partículas, Johnston y col., 2010).

En primer lugar evaluamos la citotoxicidad de las AgNPs de 157 nm a las concentraciones de 0,84; 1,6; 3,36; 6,72 y 13,45  $\mu\text{g/ml}$  (24, 48 y 72 horas) usando los métodos MTT y LDH en las cuatro líneas celulares descritas. El ensayo MTT determina la capacidad de las mitocondrias de células viables para reducir el MTT soluble (amarillo) en cristales de formazán insolubles (púrpura). La disminución de la reducción de MTT a formazán indica un descenso en el metabolismo mitocondrial de las células. Los resultados en este estudio mostraron que las células tumorales fueron más sensibles que los fibroblastos. En las células tumorales no se observó disminución de la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento con las AgNPs de 157 nm (0,84-13,45  $\mu\text{g/ml}$ ). Sin embargo, se observó un descenso significativo de la supervivencia celular tras el tratamiento con 13,45  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas, llegando a un 7% y 46% de la viabilidad celular en HepG2 y HL-60, respectivamente (**Figuras 2 y 3, artículo 1**). En los fibroblastos de piel y pulmón no se observó citotoxicidad a ninguna de las concentraciones y tiempos de incubación evaluados, excepto después del tratamiento con 13,45  $\mu\text{g/ml}$  durante 72 horas que disminuyó la supervivencia celular de los fibroblastos de pulmón al 34% (**Figuras 4 y 5, artículo 1**).

El ensayo LDH es otro método colorimétrico que determina la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo debido al daño en la integridad de la membrana celular. El aumento de la liberación de esta enzima indica la disminución de la viabilidad celular. Los resultados obtenidos tras el tratamiento con las AgNPs de 157 nm fueron muy similares a los del

método MTT. En las células tumorales se observó un aumento de más del 50% de LDH después del tratamiento con 13,45  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas (50-95% de LDH en HepG2; 60-64% de LDH en HL-60) (**Figuras 2 y 3, artículo 1**). Los fibroblastos de piel resultaron ser los más resistentes presentando un 36% de LDH liberada a la concentración de 13,45  $\mu\text{g/ml}$  (72 horas) (**Figura 4, artículo 1**). Finalmente, los fibroblastos de pulmón mostraron un porcentaje superior al 50% de LDH liberada tras el tratamiento de 13,45  $\mu\text{g/ml}$  a las 72 horas (63%) (**Figura 5, artículo 1**).

En resumen, las AgNPs de 157 nm inducen citotoxicidad dosis dependiente en las cuatro líneas celulares estudiadas, siendo las células tumorales más sensibles al tratamiento que las células normales. Sin embargo, no fue posible determinar la  $\text{IC}_{50}$  (concentración de inhibición del 50% de la viabilidad celular) a las 24 horas en ninguna de las líneas celulares, ya que la viabilidad celular siempre fue mayor del 50%. Por esta razón y por su tamaño (157 nm) [a pesar de que no hay consenso sobre el tamaño mínimo o máximo de un NM, algunos autores restringen su tamaño de 1 a 100 nm, (The Royal Society, 2004; Borm y col., 2006)], se decidió no continuar con el estudio de estas AgNPs y centrarnos en las AgNPs de 4.7 y 42 nm que sí están incluidas en el intervalo de tamaño de los NMs. Según la recomendación de la Comisión Europea del 18 de octubre de 2011, nanomaterial se define como “*un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm*”.

Los resultados obtenidos con el tratamiento de las AgNPs de 4.7 nm recubiertas con PEI (polieterimida) y PVP (polivinilpirrolidona) (0,84-13,45  $\mu\text{g/ml}$ ) y las AgNPs de 42 nm no recubiertas o desnudas (6,72-2000  $\mu\text{g/ml}$ ) mostraron una disminución dosis dependiente en la reducción del MTT a formazán con el incremento de las concentraciones en las células HepG2 (**Figura 3, artículo 2**), HL-60 (**Figura 4, artículo 2**), NHDF (**Figuras 2 y 3, artículo 3**) y HPF (**Figura 1, artículo 4**). Además, con el ensayo LDH se observó un aumento de la liberación de la LDH al medio de cultivo con el incremento de las dosis de las AgNPs de 4.7 nm (0,84- 13,45  $\mu\text{g/ml}$ ) y de las AgNPs de 42 nm (6,72-2000  $\mu\text{g/ml}$ ), lo que indica que la viabilidad celular disminuyó de manera dosis dependiente en todas las líneas celulares estudiadas, células HepG2 (**Figura 3, artículo 2**), HL-60 (**Figura 4, artículo 2**), NHDF (**Figuras 2 y 3, artículo 3**) y HPF (**Figura 1, artículo 4**). La reducción de la viabilidad

celular, es uno de los efectos tóxicos publicados en casi todos los experimentos realizados con AgNPs en cultivos celulares, lo que indica que estas NPs afectan potencialmente a la supervivencia de las células perturbando la estructura y el metabolismo mitocondrial (Asharani y col., 2009; Chairuangkitti y col., 2013; Sun y col., 2013). Faedmaleki y col. (2014) observaron la reducción de la actividad mitocondrial de las células HepG2 y de las células hepáticas de ratón tras la exposición a las AgNPs de 20-40 nm (1-400  $\mu\text{g/ml}$ ), mediante el ensayo MTT. Resultados similares se han publicado con AgNPs de diferentes tamaños (7-100 nm) en distintas líneas celulares, tales como queratinocitos humanos (HaCaT) (11-36  $\mu\text{g/ml}$ ), células hepáticas humanas (0,5-3  $\mu\text{g/ml}$ ) y murinas (10-50  $\mu\text{g/ml}$ ), macrófagos alveolares (10-75  $\mu\text{g/ml}$ ), fibroblastos dérmicos murinos (30  $\mu\text{g/ml}$ ) o células madre germinales de ratón (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (Braydich-Stolle y col., 2005; Hussain y col., 2005; Carlson y col., 2008; Kim y col., 2009; Arora y col., 2009).

La toxicidad de las AgNPs de 4.7 nm fue comparada con la observada por las AgNPs de 42 nm. Basándonos en el valor de la  $\text{IC}_{50}$ , las AgNPs de 4.7 y 42 nm mostraron una drástica diferencia en la citotoxicidad. Las AgNPs pequeñas fueron mucho más citotóxicas que las grandes. En las células HepG2, las AgNPs de 42 nm mostraron una  $\text{IC}_{50}$  de 83,1 y 65,8  $\mu\text{g/ml}$  (MTT/LDH, respectivamente), mientras que la  $\text{IC}_{50}$  de las AgNPs de 4.7 nm fue de 2,3 y 2,2  $\mu\text{g/ml}$  (MTT/LDH, respectivamente), alrededor de 40 veces más citotóxica (**Tabla 3, artículo 2**). Las AgNPs de 4.7 nm en las células HL-60 presentaron una  $\text{IC}_{50}$  de 9,46 y 8,64  $\mu\text{g/ml}$  (MTT/LDH, respectivamente) unas 44 veces más citotóxicas que las AgNPs de 42 nm ( $\text{IC}_{50}$  de 420 y 300  $\mu\text{g/ml}$ , MTT/LDH, respectivamente) (**Tabla 3, artículo 2**). En los fibroblastos de piel las AgNPs de 4.7 nm mostraron una  $\text{IC}_{50}$  de 4,17 y 5,01  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la  $\text{IC}_{50}$  de las AgNPs de 42 nm fue de 2000 y 1959  $\mu\text{g/ml}$ , 400 veces menos citotóxica (**Figuras 2 y 3, artículo 3**). Por último, en los fibroblastos de pulmón las AgNPs de 4.7 nm fueron aproximadamente 149 veces más citotóxicas ( $\text{IC}_{50}$  de 7,7 y 6,8  $\mu\text{g/ml}$ , MTT/LDH, respectivamente) que las AgNPs de 42 nm ( $\text{IC}_{50}$  de 1150 y 548,3  $\mu\text{g/ml}$ , MTT/LDH, respectivamente) (**Tabla 1, artículo 4**). Por lo tanto, en este trabajo de investigación demostramos que el tamaño de las AgNPs es uno de los parámetros físico-químicos que más influyen en su toxicidad.

El tamaño de las NPs además de influir en su toxicidad (Cha y col., 2008; Hsin y col., 2008), también lo hace en su distribución tisular (De Jong y col., 2008), en la penetración intestinal y dérmica (Sonavane y col., 2008) y, en la captación celular (Chithrani y col.,

2006). Desde el punto de vista toxicológico, la mayoría de los estudios indican que el tamaño de las NPs tienen un efecto con una relación inversamente proporcional entre el tamaño y el potencial tóxico. Esta relación inversa se explica por el hecho de que las partículas más pequeñas tienen una mayor proporción de átomos superficiales (Luyts y col., 2013). Auffan y col. (2009) postularon que la mayoría de los tipos de NPs tienen un tamaño crítico de aproximadamente 30 nm por debajo del cual las NPs poseen propiedades típicas “nano” diferentes a las del mismo material en su tamaño original. Por debajo del tamaño crítico, las NPs se caracterizan por poseer un exceso de energía superficial y son por tanto, termodinámicamente menos estables resultando en una mayor reactividad superficial. En consecuencia una mayor cantidad de átomos superficiales con una mayor potencia a reaccionar debido a las inestabilidad termodinámica son la clave para el aumento de toxicidad de estas NPs. Park y col. (2011a) y Gliga y col. (2014) estudiaron los efectos dependientes del tamaño de las AgNPs en monocitos humanos (U937) y células epiteliales bronquiales humanas (BEAS-2B), respectivamente. Ambos estudios mostraron que las AgNPs más pequeñas (4 nm en el estudio de Park y 10 nm en el estudio de Gliga) indujeron una mayor disminución de la viabilidad celular en comparación con las AgNPs más grandes (20 y 70 nm en el estudio de Park y 40 y 75 nm en el estudio de Gliga). Además, Liu y col. (2010) comparando las IC<sub>50</sub> encontraron que las AgNPs de 5 nm eran más tóxicas que las AgNPs de 20 y 50 nm en cuatro líneas celulares (A549, HepG2, MCF-7, SGC-7901).

Además del tamaño de las NPs, el recubrimiento de las AgNPs es otra característica distintiva entre las AgNPs de 4.7 y 42 nm, pudiendo afectar también a la toxicidad de estas, ya que la superficie química puede influir en la interacción de las AgNPs con las células. En nuestro estudio, las AgNPs de 42 nm están desnudas (sin recubrimiento) mientras que las AgNPs de 4.7 nm están recubiertas con PEI y PVP. En general, la estabilización termodinámica de las NPs se consigue mediante la adición de agentes de recubrimiento, los cuales se unen a la superficie de las NPs a través de enlaces covalentes o por interacción química. Estos agentes de recubrimiento son esenciales para evitar la agregación de las NPs y aumentar la solubilidad de estas (Lima y col., 2012). La naturaleza química de estos agentes de recubrimiento es muy importante, ya que algunos agentes son más tóxicos que otros. Según las recomendaciones de la OCDE, los recubrimientos de las NPs con PVP y citrato están reconocidos como los más y los menos estables, respectivamente (Tejamaya y col., 2012). Sin embargo, en un reciente estudio llevado a cabo por Gliga y col. (2014), no se observaron diferencias citotóxicas entre AgNPs de 10 nm recubiertas con citrato y PVP, en



las células BEAS-2B. En estudios anteriores se observó que las AgNPs recubiertas con polisacáridos dieron lugar a un daño mayor en el ADN que las AgNPs sin recubrimiento. Se sugiere que las AgNPs no recubiertas se aglomeran y no entran al núcleo, mientras que las AgNPs recubiertas con macromoléculas, tales como polisacáridos, polímeros solubles en agua o proteínas, pueden aumentar la probabilidad de entrar en la mitocondria y en el núcleo (Kittler y col., 2010; Ahamed y col., 2008). En este trabajo de investigación, las AgNPs desnudas, sin recubrimiento (42 nm) fueron menos citotóxicas que las AgNPs recubiertas (4.7 nm).

En el presente estudio también fue comparada la respuesta celular de las distintas líneas a las AgNPs (4.7 y 42 nm). El tratamiento con ambas AgNPs redujo significativamente la viabilidad de las cuatro líneas celulares, sin embargo como se puede observar en los valores de IC<sub>50</sub> anteriormente descritos, las líneas celulares presentaron diferentes susceptibilidades a dichos tratamientos. Las células HepG2 fueron las más sensibles al tratamiento de ambas AgNPs, hasta 4 veces más que las más resistentes al tratamiento con las AgNPs de 4.7 nm, las células HL-60, y sobre 24 veces más que las células NHDF, las más resistentes al tratamiento de las AgNPs de 42 nm. Kim y col. (2009) también estudiaron la citotoxicidad de AgNPs menores de 10 nm en células HepG2. Las células mostraron una enorme sensibilidad al tratamiento con las AgNPs (IC<sub>50</sub> de 3,38 µg/ml por el ensayo MTT y 0,53 µg/ml por el ensayo LDH). Sambale y col. (2015) estudiaron el efecto de las AgNPs de 70 nm en diferentes líneas celulares, fibroblastos de rata (NIH-3T3), carcinoma pulmonar humano (A-549), feocromocitona adrenal de rata (PC-12) y células HepG2. También observaron diferencias entre líneas, siendo las líneas celulares de rata más sensibles que las humanas. Sin embargo, Arora y col. (2008) no observaron diferencias de citotoxicidad tras el tratamiento con AgNPs entre células de fibrosarcoma humano (HT-1080) y carcinoma de piel humano (A431). Las diferencias entre las líneas celulares pueden ser debidas a la variación en la fisiología de las células (por ejemplo, epitelial o linfóide) o al estado de proliferación (tumores o normales), además de características de la membrana y características fagocíticas entre los diferentes tipos de células (Díaz y col., 2008). Estudios de investigación revelan que las NPs pueden producir efectos distintos en células normales y tumorales ya que las membranas lisosomales pueden soportar diferentes estímulos en los dos tipos celulares y la capacidad de contrarrestar el estrés oxidativo es muy diferente para los dos tipos celulares (Wang y col., 2011; Zhang y col., 2013).

Entre los dos ensayos de citotoxicidad utilizados en este trabajo de investigación (MTT y LDH) en las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF, el ensayo de la LDH, como se puede observar en los valores de la IC<sub>50</sub> calculados por ambos métodos, fue ligeramente más sensible. Esto sugiere que la integridad de la membrana celular se ve afectada más fácilmente por las AgNPs que la actividad metabólica. De acuerdo con nuestros resultados, Kim y col. (2009) también observaron que la IC<sub>50</sub> de las AgNPs determinada por el ensayo de la LDH fue menor que la calculada con el MTT, en las células HepG2. Del mismo modo Gaiser y col. (2013) mostraron valores de la IC<sub>50</sub> más bajos con el ensayo de la LDH en comparación con el ensayo Alamar Blue utilizando AgNPs de 4-25 nm en la línea celular hepática humana C3A. Esto puede indicar un mecanismo específico de toxicidad de las suspensiones de AgNPs dirigidas a la membranas y particularmente a las de los lisosomas. Es posible que las AgNPs puedan causar daño lisosómico a concentraciones de exposición más bajas. De hecho, la perturbación lisosomal se ha descrito en una variedad de NMs (Stern y col., 2012) y se considera como un mecanismo emergente de toxicidad de los NMs. Según un estudio de Yue y col. (2015), utilizando células branquiales de la trucha arcoíris (RTgill-W1), la integridad de la membrana lisosomal fue significativamente sensible a la toxicidad de las AgNPs recubiertas con citrato. Además, también demostraron que la cisteína puede proteger frente a la actividad metabólica y al daño a la membrana celular pero no frente a los daños lisosómicos, en el caso de las AgNPs.

### **V.3. GENOTOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

La integridad del ADN genómico está constantemente amenazada, incluso en células sanas. El daño al ADN celular puede resultar de la acción de las EROs endógenas o de errores en la replicación o recombinación, así como por tóxicos ambientales (Franco y col., 2009). Un aspecto importante en el análisis del riesgo dentro de la evaluación del peligro es la posibilidad de que un nuevo agente pueda inducir genotoxicidad, daños en el material genético que pueda resultar en la inducción o promoción de carcinogénesis, además de efectos reproductivos si se ve comprometido el ADN de células germinales (Doak y col., 2012). Las AgNPs tienen la capacidad de causar estrés oxidativo mediante la producción de las EROs, pero además, las AgNPs pueden interaccionar directamente con el ADN y provocar alteraciones del huso mitótico y sus componentes.

Las pruebas de genotoxicidad de las NPs pueden realizarse tanto *in vitro* como *in vivo*. El enfoque *in vitro* es apropiado para las pruebas de genotoxicidad primaria, mientras que los modelos *in vivo* también proporcionan información sobre efectos secundarios tales como la inflamación (Kisin y col., 2007, Vega-Villa y col. 2008; Dusinska y col., 2011, Arora y col. 2012). Actualmente, no existen métodos de ensayo estandarizados para evaluar la genotoxicidad de las NPs. Sin embargo, la guía de la EFSA de 2011 para evaluar el riesgo de la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología en los alimentos y en la cadena alimentaria, recomienda una serie de pruebas para estudiar la genotoxicidad de los NMs tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo ensayos para evaluar los tres puntos críticos de la genotoxicidad: mutación genética, aberraciones cromosómicas estructurales y aberraciones cromosómicas numéricas (EFSA Comité Científico, 2011a). El ensayo de mutación reversa bacteriana suele recomendarse para la detección de mutaciones genéticas (EFSA Scientific Committee, 2011b). Sin embargo, esta prueba no se recomienda y no se considera apropiada para la evaluación de la genotoxicidad de las NPs, ya que las NPs no son capaces de atravesar la pared bacteriana (Landsiedel y col., 2009), y porque a diferencia de las células de los mamíferos, las células bacterianas no tienen la capacidad de fagocitar las NPs. La EFSA recomienda como estudios *in vitro* el test de inducción de mutación genética en células de mamífero o el ensayo de los micrónúcleos. Si al menos un ensayo *in vitro* indica actividad genotóxica, normalmente se requiere un seguimiento mediante pruebas *in vivo* (Eastmond y col., 2009). Los ensayos recomendados son el ensayo Cometa o el ensayo de los micronúcleos.

La mayoría de los ensayos experimentales para identificar compuestos genotóxicos en humanos estudian los efectos biológicos que resultan como consecuencia del daño al ADN (formación de micronúcleos, mutaciones, aberraciones cromosómicas, etc.). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado técnicas para la detección directa de daños al ADN, y uno de los principales avances es la electroforesis alcalina de células individuales o ensayo Cometa. El ensayo Cometa es un método sensible cada vez es más utilizado en nanotoxicología para estudios de genotoxicidad (Karlsson, 2010).

### **V.3.1. Genotoxicidad *in vitro***

En el presente trabajo de investigación, para determinar si las AgNPs de 4.7 y 42 nm inducen daño al ADN, evaluamos la ruptura de las cadenas de ADN y el daño oxidativo

(oxidación de purinas y pirimidinas) al ADN en las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF, utilizando el ensayo Cometa. Los resultados obtenidos indican que ambas AgNPs (4.7 y 42 nm) aumentaron significativamente el daño al ADN después de 24 horas de tratamiento en todas las líneas celulares evaluadas (**Figuras 1 y 2, artículo 5**).

Comparando el daño al ADN en las cuatro líneas celulares con las AgNPs a la misma concentración (1,6 µg/ml), observamos que las de 4.7 nm fueron más genotóxicas que las de 42 nm. En las células HepG2, las AgNPs de 4.7 nm indujeron un 50.8% de ADN en la cola, mientras que con las AgNPs de 42 nm solo un 40.1% (**Figuras 1 A, 2 A**). El porcentaje de ADN en la cola tras el tratamiento de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las células HL-60 fue de 60.8% y 47.6%, respectivamente (**Figuras 1 B, 2 B**). Finalmente, en los fibroblastos, NHDF y HPF, las AgNPs de 4.7 nm indujeron un 63.5% y 65.6% de ADN en la cola, respectivamente, mientras que las AgNPs de 42 nm indujeron un 45.5% y 55%, respectivamente (**Figuras 1 C, 1 D, 2 C, 2 D**). Por tanto, las AgNPs de 4.7 nm son más genotóxicas que las AgNPs de 42 nm. El efecto genotóxico de las AgNPs (5-260 nm) ha sido observado en diferentes estudios *in vitro* en células humanas y animales (Ahamed y col., 2008; AshaRani y col., 2009; Kawata y col., 2009; Foldberg y col., 2011; Hackenberg y col., 2011; Kim y col., 2011; Flower y col., 2012; Li y col., 2012; Nymark y col., 2013). De acuerdo con nuestros resultados, Park y col. (2011b) también observaron genotoxicidad dependiente del tamaño de las AgNPs en fibroblastos embrinarios (MEF-Lacz), siendo las AgNPs de 20 nm mucho más genotóxicas que las de 80 y 113 nm. Sin embargo, Gliga y col. (2014) observaron, usando el ensayo Cometa, que las AgNPs de 10, 40 y 75 nm indujeron un daño al ADN similar en células pulmonares después de 24 horas de tratamiento. Como discutió Barillet y col. (2010), los estudios *in vitro* muestran que las NPs de menor tamaño puede llegar al núcleo a través de poros nucleares (diámetro entre 8 y 10 nm), mientras que las NP más grandes sólo pueden tener acceso al ADN en la división de las células, durante la mitosis cuando la membrana nuclear se disuelve (Singh y col., 2009; Liang y col., 2008).

Además, al contrario de lo observado en los ensayos de citotoxicidad, las células HepG2 fueron las más resistentes al daño genotóxico de ambas AgNPs. Los diferentes tipos de células (epiteliales, macrófagos, neuronales, etc...) varían en su actividad metabólica (Vevers y Jha, 2008). Las líneas celulares del mismo o de diferente tejido pueden presentar diferente susceptibilidades a la exposición de las NPs a causa de la variación en enzimas metabólicas, receptores de superficie celular, capacidad antioxidante y reparadora del ADN, presencia de

diferentes enzimas y hormonas, etc. Todos estos factores pueden afectar al comportamiento, y a la interacción de las NPs con las diferentes células (Magdolenova y col., 2014).

El daño oxidativo inducido por ambas AgNPs también se evaluó en las cuatro líneas celulares. Para este fin, las bases oxidadas dañadas se detectaron mediante la adición de dos enzimas específicas reparadoras, Endo III y Fpg, en el ensayo Cometa. Nuestros resultados mostraron que las AgNPs de 4.7 nm (1,6 µg/ml) provocaron un incremento significativo de la oxidación de las purinas en las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF (12%, 12%, 13.5% y 6.5% de incremento del ADN en la cola con respecto al control, respectivamente) (**Figuras 3 A, 4 A, 5 A, 6 A, artículo 5**). Sin embargo, el incremento en la oxidación de las pirimidinas causada por las AgNPs de 4.7 nm (1,6 µg/ml) fue significativo únicamente en las células HL-60, NHDF y HPF (9.4%, 7.5% y 7% de incremento del ADN en la cola con respecto al control, respectivamente) (**Figuras 4 A, 5 A, 6 A**). Las AgNPs de 42 nm (6,7 µg/ml) también provocaron un incremento significativo en la oxidación de las pirimidinas y purinas en las células HepG2 (**Figura 3 B**) (7.5% y 13% de incremento de ADN en la cola con respecto al control, respectivamente), HL-60 (**Figura 4 B**) (10% y 17.3% de incremento de ADN en cola con respecto al control, respectivamente) y NHDF (**Figura 5 B**) (9.5% y 14.5% de incremento de ADN en la cola con respecto al control, respectivamente). Sin embargo, en las células HPF no se observó daño oxidativo en las purinas ni en las pirimidinas del ADN tras el tratamiento con las AgNPs de 42 nm (**Figura 6 B**). El daño oxidativo al ADN tras el tratamiento de AgNPs de 43 nm y 5 nm ha sido también descrito en células humanas epiteliales bronquiales y en células de linfoma murino, respectivamente (Kim y col., 2011; Mei y col., 2012). Por tanto, observamos que las AgNPs de 4.7 y 42 nm pueden inducir un desequilibrio oxidativo en las células, pudiendo promover la formación de las EROs, y contribuir así al efecto genotóxico de las mismas.

Nuestros resultados también mostraron que las células NHDF y HL-60 fueron las más sensibles a la oxidación de las bases pirimidínicas y púricas. Además, nuestro estudio muestra que los valores de las purinas oxidadas fueron superiores a los de las pirimidinas tras el tratamiento con las AgNPs de 4.7 nm y 42 nm en las células HepG2 (26-14% y 25-18% de ADN en cola, respectivamente), HL-60 (16-14.8% y 23-15% de ADN cola, respectivamente), NHDF (24-14% y 25-18% de ADN en cola, respectivamente) y HPF (11-10% y 8-3% de ADN en cola, respectivamente). Este resultado es consistente con otros estudios que han observado que las purinas son más vulnerables al daño oxidativo al ADN que las pirimidinas,

ya que éstas últimas se pueden reparar más rápidamente transfiriendo un electrón a las purinas (Jovanovic y Simic, 1986). Con estos resultados, observamos que la inducción de las roturas de las cadenas tras la adición de las enzimas Endo III y Fpg aumenta, por lo que los tratamientos con AgNPs de 4.7 y 42 nm provocan principalmente la oxidación de los nucleótidos.

### V.3.2. Genotoxicidad *in vivo*

A pesar del creciente interés de los riesgos genotóxicos relacionados con los nuevos NMs, solo existen unos pocos datos sobre la genotoxicidad *in vivo* de las AgNPs (De Lima y col., 2012). En el presente trabajo de investigación el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en *Drosophila Melanogaster* fue utilizado para evaluar la genotoxicidad *in vivo* de las AgNPs de 4.7 y 42 nm. Cabe señalar que el ensayo SMART empleado en este estudio presenta una serie de ventajas a la hora de evaluar la actividad genotóxica de diferentes tipos de agentes, tanto físicos como químicos. Una de las principales ventajas radica en que es una prueba de corta duración, lo cual implica una evaluación rápida, sencilla y económica de cualquier agente. Además, se trata de un ensayo *in vivo* que utiliza un organismo eucariota no mamífero, evitando así los problemas de limitación en el número de individuos utilizados que lógicamente conllevan los ensayos con mamíferos.

En el presente estudio, el tratamiento con AgNPs de 4.7 y 42 nm se evaluó en la progenie larval (larvas de tercer estadio) de los cruces estándar (ST) (hembras vírgenes de la cepa *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>* con machos *mwh/mwh*) y los cruces de alta bioactivación (HB) (hembras vírgenes de la cepa *ORR; flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>* con machos *mwh/mwh*). Este último cruce mejora la sensibilidad del ensayo en el caso de compuestos promutagénicos activados a través de las vías metabólicas dependientes del citocromo P450 (Saner y col., 1996). Los resultados obtenidos en ambos cruces mostraron que las AgNPs de 4.7 nm (25, 30 y 50 µg/ml) y 42 nm (250, 500 y 1000 µg/ml) no indujeron incrementos significativos en la frecuencia de ninguna de las tres categorías de clones mutantes analizados (clones simples pequeños, clones simples grandes y clones dobles), indicando así la ausencia de mutaciones o actividad recombinogénica en el rango de concentraciones evaluadas (**Tablas 2 y 3, artículo 6**).

Estos resultados son contradictorios con los observados en nuestros estudios *in vitro* con el ensayo cometa. Hay que tener en cuenta que los resultados *in vitro* pueden no reflejar el

potencial genotóxico de los AgNPs, ya que bajo condiciones *in vivo*, las AgNPs pueden actuar de manera considerablemente diferente (Klien y Godnic-Cvar, 2012). De acuerdo con nuestros resultados, Tavares y col. (2012) también observaron diferencias entre los estudios *in vivo* e *in vitro* sobre los efectos genotóxicos de AgNPs (5-45 nm). En los estudios *in vitro* realizados en células sanguíneas humanas observaron efectos genotóxicos de las AgNPs a todas las concentraciones evaluadas (10, 25 y 50 µg/ml), mientras que en los estudios *in vivo* con ratones Swiss no fueron capaces de observar efectos genotóxicos a ninguna concentración (10, 25 y 50 µg/kg de peso vivo). Esta diferencia entre los estudios *in vivo* e *in vitro* podría ser debido entre otros factores a la activación de las defensas antioxidantes en los animales y a la naturaleza hidrófoba de las AgNPs. En condiciones *in vitro*, la naturaleza hidrófoba se puede modificar, pudiendo atraer sobre su superficie las proteínas presentes en el medio de cultivo y ser así más fácilmente capturadas por las células (Oberdörster y col., 2005). Otros estudios *in vivo* tampoco han observado efectos genotóxicos de las AgNPs, como por ejemplo en embriones de peces cebra, en los cuales las AgNPs con diferentes recubrimientos y diferentes tamaños no presentaron genotoxicidad a la concentración de 25 µg/ml (Asharani y col., 2008; 2011). En el caso de estudios *in vivo* usando ratas Sprague-Dawley tampoco se observó un incremento significativo en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados después de 90 días de inhalación con AgNPs de 18 nm y 28 días de tratamiento oral con AgNPs de 60 nm (Kim y col., 2008; 2011). Según nuestro conocimiento, solo existe un estudio de genotoxicidad *in vivo* de las AgNPs usando el ensayo SMART en *Drosophila* en el cual sí observaron pequeñas pero significativas diferencias en el incremento de clones mutantes (Demir y col., 2011).

Por tanto, el potencial genotóxico de los NMs no es concluyente hasta la fecha ya que los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo* parecen depender no sólo del tipo de NPs, si no también del diseño experimental, incluyendo el sistema de ensayo y la vía de exposición, la concentración administrada y el organismo diana (Gonzalez y col., 2011; Hennes y col., 2014).

Sin embargo, en el presente trabajo de investigación a pesar de no encontrar efectos genotóxicos de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en *Drosophila* con el ensayo SMART de alas, pudimos observar otros procesos biológicos. Tras la ingestión durante el periodo larvario de ambas AgNPs, las moscas adultas resultantes de ambos cruces presentaron defectos en la melanización de la cutícula (**Figura 1, artículo 6**) y reducción en la actividad locomotora a

todas las concentraciones evaluadas (AgNPs de 4.7 nm: 25, 30 y 50  $\mu\text{g/ml}$  y AgNPs de 42 nm: 250, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Como se puede observar en la **Figura 1**, las moscas adultas pertenecientes a las larvas expuestas a las AgNPs presentaron una despigmentación de la cutícula comparado con las moscas control. Estos mismos efectos fueron observados en estudios llevados a cabo por Posgai y col. (2011), Key y col. (2011) y Armstrong y col. (2013) después de la ingestión de AgNPs de diferentes tamaños durante el periodo larvario.

La pigmentación de la cutícula es el resultado principalmente de la síntesis bioquímica de las melaninas a través de precursores de catecolaminas dopa y dopamina, sintetizados a partir de la tirosina (Prota, 1992). Por otro lado, el metabolismo de la dopamina puede generar EROs que pueden afectar al sistema nervioso y en general afectar negativamente a la longevidad (Pérez y Hastings, 2004). Las AgNPs de alguna manera interfieren con la biosíntesis de melanina durante el desarrollo larvario. La pigmentación cuticular es un proceso esencial en la vida de los insectos debido a su participación en diversas funciones, que incluye inmunidad, duración de la vida y manifestaciones conductuales como la resistencia a la desecación (Brisson y col., 2005), alimentación, dominación social, preferencia de pareja y exhibición del cortejo (Wittokpp y Beldade, 2009). Por lo tanto, el efecto de desmelanización observado en el laboratorio en *Drosophila* a unas concentración no tóxicas podría ser importante en las poblaciones de insectos en la naturaleza ya que estas poblaciones podrían desarrollar alteraciones en sus procesos biológicos.

Se ha descrito que la despigmentación puede ser debida a la inducción de una respuesta de estrés, y esto puede estar asociado con un aumento de la expresión de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) (Denman y col., 2008; Galván y Alonso-Alvarez, 2009; Glassman, 2011; Ong y col., 2015). Armstrong y col. (2013) demostraron a su vez, que las AgNPs ejercían acción sobre la actividad del enzima Cu-ZnSOD, lo cual concuerda con la teoría acerca de que los efectos nanotóxicos surgen de las EROs. Cu-ZnSOD es una enzima esencial en las moscas, la cual se encarga de la dismutación de los radicales superóxido principalmente en el citoplasma (Phillips y col., 1989). Además, se sugiere que los defectos de la pigmentación están asociados con una disminución de la longevidad y la actividad locomotora (Walter y col., 1991; Drapeau y col., 2003; Suh y Jackson, 2007; Key y col., 2011). Por tanto, la reducción de la capacidad de movimiento que observamos en el presente trabajo en las moscas pertenecientes a larvas alimentadas con AgNPs, puede estar asociada a los defectos de pigmentación de las mismas.



## **V.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

### **V.4.1. Estrés oxidativo**

La mayoría de los estudios hasta la fecha sugieren que la generación de las EROs y el estrés oxidativo están asociados a la toxicidad de las NPs (Saquib y col., 2012; Yu y col., 2013). En concreto, las EROs dañan macromoléculas celulares, como los sustratos lipídicos, los hidratos de carbono, las proteínas, el ARN y el ADN, inhibiendo los procesos metabólicos fundamentales y desencadenando como respuesta al estrés celular, inflamación y apoptosis (Ueda y col., 1998; Huang y col., 2010).

Algunos de los factores claves que favorecen los efectos prooxidantes de los NMs incluyen el agotamiento de los antioxidantes o el aumento de la producción de las EROs (Manke y col., 2013). Estudios científicos indican que las AgNPs pueden acumularse fuera de las mitocondrias, principal fuente intracelular de EROs, y causar una disfunción mitocondrial además de perturbar la función de la cadena respiratoria, desencadenando la producción de EROs y el estrés oxidativo (AshaRani y col., 2009). Las EROs interrumpen la cadena respiratoria mitocondrial y la síntesis de ATP, provocando finalmente daño al ADN (Gurunathan y col., 2015a; Gurunathan y col., 2015b; AshaRani y col., 2009). La producción excesiva de EROs puede dar lugar a su vez a la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), facilitando la liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo c y la procaspasa-9 (vía intrínseca) (Hsin y col., 2008; Park y col., 2010).

Por tanto, en el estrés oxidativo celular intervienen factores como la captación celular de partículas extrañas o las propiedades redox y las propiedades catalíticas de las partículas internalizadas (Lynch y col., 2006; Auffan y col., 2008). Para investigar si las AgNPs de 4.7 y 42 nm inducen estrés oxidativo en las cuatro líneas celulares utilizadas, en el presente trabajo de investigación se determinó la producción de las EROs intracelulares, el efecto protector de la NAC (N-acetilcisteína), la actividad de la SOD (superóxido dismutasa) y los niveles de la GSH (glutación). La producción de las EROs intracelulares se cuantificó por citometría de flujo mediante la fluorescencia de la sonda DCF a diferentes tiempos de incubación de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las células HepG2, HL-60 (**Figura 6, artículo 2**), NHDF (**Figura 5, artículo 3**) y HPF (**Figura 3 A, artículo 4**). La producción de las EROs en las células HepG2 comenzó inmediatamente, alcanzando niveles máximos (2.03 veces más

que el control) a los 15 minutos después de la exposición de las AgNPs de 4.7 nm (1,62  $\mu\text{g/ml}$ ) (**Figura 6 A, artículo 2**). Sin embargo, con las AgNPs de 42 nm (13,45  $\mu\text{g/ml}$ ) la producción de las EROs fue menor, alcanzando lo niveles máximos (1.55 veces más que el control) a las 24 horas de tratamiento (**Figura 6 A, artículo 2**). Ambas AgNPs disminuyeron la producción de las EROs alcanzando niveles basales a las 48 horas.

Como se muestra en la **Figura 6 B, (Artículo 2)** la producción de las EROs en las células HL-60 tratadas con las AgNPs de 4.7 nm (3,36  $\mu\text{g/ml}$ ) y 42 nm (13,45  $\mu\text{g/ml}$ ) alcanzó el máximo nivel tras 24 h de incubación (1.64 y 1.21 veces más que el control, respectivamente) y disminuyó hasta niveles basales a las 48 h. En las células NHDF (**Figura 5, artículo 3**) se observó un incremento de los niveles de las EROs después del tratamiento con las AgNPs de 4.7 nm (3,36  $\mu\text{g/ml}$ ) y 42 nm (100  $\mu\text{g/ml}$ ), alcanzando una señal máxima tras 3 y 24 horas de tratamiento, respectivamente (2.41 y 1.76 veces más que el control, respectivamente). Finalmente, en las células HPF (**Figura 4 A, artículo 4**) la producción de las EROs fue ligeramente menor, alcanzando su máximo nivel tras 30 minutos (1.32 veces más que el control) y 24 horas (1.55 veces más que el control) del tratamiento con las AgNPs de 4.7 nm (7,66  $\mu\text{g/ml}$ ) y 42 nm (1000  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivamente.

Nuestros resultados coinciden con numerosos estudios que han demostrado que el estrés oxidativo está relacionado con los cambios encontrados en células de mamífero y de peces después de la exposición a las AgNPs. La producción de las EROs detectada con la sonda basada en diclorofluoresceína en la mayoría de los estudios, comienza tras el tratamiento de las células con AgNPs a la concentración de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  o superior (Asharani y col., 2009; Braydich-Stolle y col., 2010; Carlson y col., 2008; Eom y Choi, 2010; Foldbjerg y col., 2009, 2011; Hsin y col., 2008; Hussain y col., 2005, 2006; Kim y col., 2009; Liu y col., 2010; Nishanth y col., 2011; Piao y col., 2011; Sanpui y col., 2011; Schrand y col., 2008). Por ejemplo, Kim y col. (2012) publicaron que las AgNPs de tamaños de 10, 50 y 100 nm indujeron la producción de las EROs entre un 50-60% más que el control en las líneas celulares MC3T3 y PC12 de manera dosis y tamaño dependiente. Además, el pretratamiento de células con cianuro, un inhibidor de la actividad de transferencia de electrones de citocromo c oxidasa en la mitocondria, provocó la inhibición de la producción de las EROs inducida por las AgNPs (Hsin y col., 2008). Estos resultados sugieren que las mitocondrias están involucradas en la producción de las EROs inducida por las AgNPs.

La inducción de la producción de las EROs por las AgNPs también dependió del tamaño de las NPs y de la línea celular. En este caso, las células HepG2 fueron las más sensibles a la producción de las EROs, seguida de las células NHDF. Como se puede observar además en la **Figura 6 (artículo 2)**, la **Figura 5 (artículo 3)**, y la **Figura 3 A (artículo 4)**, las AgNPs de menor tamaño (4.7 nm) provocaron una mayor producción de las EROs que las AgNPs de 42 nm en las cuatro líneas celulares. Otros autores también han observado diferencias en la producción de las EROs en función de los tamaños de las AgNPs (Park y col., 2011b; Carlson y col., 2008). Ambos autores mostraron que las AgNPs de menor tamaño (4 y 15 nm, respectivamente) indujeron una mayor producción de las EROs en macrófagos, mientras que las de mayor tamaño (70 y 55 nm) no indujeron la producción de las EROs. Esto puede ser debido a que las AgNPs más pequeñas son capaces de penetrar la membrana celular de los mamíferos más eficientemente que las de mayor tamaño (Kim y Ryu, 2013). Una vez internalizadas, las AgNPs más pequeñas también presentan una mayor superficie disponible para la interacción con los orgánulos celulares, lo que se traduce en una mayor citotoxicidad y una mayor producción de las EROs (Liu y col., 2010).

La NAC es un agente quimiopreventivo de naturaleza hidrofílica que protege frente al daño al ADN a través de múltiples mecanismos de acción. En concreto, es capaz de atrapar o reaccionar con las EROs procedentes del metabolismo celular gracias a su capacidad antioxidante, ya que sirve como precursor de la síntesis de glutatión (Plantin-Carrenard y col. 2000; Zafarullah y col., 2003; Nel y col., 2006). En relación con estos hallazgos, el método MTT fue utilizado para evaluar el efecto protector del NAC frente a la citotoxicidad inducida por las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las 4 líneas celulares. Para ello, las células fueron previamente pretratadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de NAC (1-20 mM) y posteriormente tratadas durante 24 horas con la IC<sub>50</sub> de las AgNPs calculada previamente. La citotoxicidad inducida por las AgNPs en las cuatro líneas celulares fue eficientemente prevenida por el tratamiento del NAC, sugiriendo por tanto que el estrés oxidativo está implicado en la toxicidad de las AgNPs (**Figura 5, artículo 2; Figura 4, artículo 3; Figura 3, artículo 4**). De acuerdo con nuestros resultados, Kim y col. (2009) también observaron que el pretratamiento con la NAC (2h, 10 mM) previno la inhibición de la reducción del MTT inducida por las AgNPs en las células HepG2.

El organismo ha adquirido a lo largo de la evolución mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. Estos mecanismos intentan prevenir la producción de las EROs, detener o

retardar la reacción de oxidación, reparar los daños que causan a las macromoléculas o degradar las lesionadas. Los mecanismos antioxidantes se agrupan en dos sistemas de defensa antioxidante: sistema enzimático y sistema no enzimático. El sistema antioxidante enzimático constituye la primera y mejor línea de defensa contra los radicales libres. Está integrado por tres enzimas principales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: superóxido dismutasa, (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); otras tres enzimas, glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST) y  $\Gamma$ -glutamyl cisteinil sintetasa (GCS), sin ser estrictamente enzimas antioxidantes, colaboran indirectamente con la GPx ya que contribuyen a regular el contenido intracelular de glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos. El sistema antioxidante no enzimático está integrado por una serie de sustancias que, aun estando presentes a bajas concentraciones, en presencia de compuestos oxidables (como ADN, proteínas o lípidos), se oxidan antes que éstos, y retrasan, inhiben, amortiguan o previenen su oxidación, la producción de radicales libres o los efectos deletéreos de éstos (Eckhardt y col., 2013). El sistema antioxidante no enzimático incluye una larga serie de compuestos de bajo peso molecular, siendo los más importantes el glutatión reducido (GSH), la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina A (trans-retinol/ $\beta$ -caroteno). Sin embargo, el exceso de las EROs puede cambiar la estructura y la función de estas moléculas perdiendo su capacidad antioxidante (Choi y col., 2011). En el presente trabajo de investigación, determinamos los niveles totales de glutatión (GSSG/GSH) y la actividad de la SOD tras la exposición de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las células HepG2, HL-60 (**Figuras 7 y 8, artículo 2**), NHDF (**Figuras 6 y 7, artículo 3**) y HPF (**Figuras 5 A y 6 A, artículo 4**).

El GSH es una molécula antioxidante que puede eliminar los radicales libres o servir como un sustrato para otras enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa. Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron una drástica disminución del contenido total de glutatión (84-99%) después de 72 horas de tratamiento con las  $IC_{50}$  de las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las células HepG2 (**Figura 7 A, artículo 2**), HL-60 (**Figura 7 B, artículo 2**), NHDF (**Figura 6, artículo 3**) y HPF (**Figura 5 A, artículo 4**). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores como Arora y col. (2008), Piao y col. (2011) y Ganapathi y col. (2014) que también observaron una disminución de los niveles de GSH después del tratamiento con AgNPs de diferentes tamaños (5-28 nm) en células epiteliales, hepáticas y de plasma humano. La disminución de los niveles de glutatión puede deberse a la unión de las AgNPs con grupos tiol (Srivastava y col., 2012;

Salma y col., 2011) o al aumento del uso de la GSH para minimizar el efecto de los radicales libres después de la exposición a las AgNPs (Adeyemi y Sulaiman, 2012). Los radicales libres activados por las AgNPs reducen el GSH en su forma oxidada, glutatión disulfuro (GSSG), contribuyendo al estrés oxidativo, a la apoptosis y a la sensibilización a los estímulos oxidantes (Rahman, 2007; Fenoglio y col., 2008). Pero además de la GSH, las EROs generadas por las NPs también pueden modular las actividades de las enzimas de metabolización de las EROs incluyendo la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Stambe y col., 2004).

Sin embargo, en nuestro trabajo de investigación, a pesar de observarse una ligera disminución de la actividad de la SOD tras el tratamiento con las IC<sub>50</sub> de las AgNPs de 4.7 y 42 nm durante 24, 48 y 72 horas, en ninguna de las líneas celulares [HepG2 (**Figura 8 A, artículo 2**), HL-60 (**Figura 8 B, artículo 2**), NHDF (**Figura 7, artículo 3**) y HPF (**Figura 6 A, artículo 4**)] este descenso fue estadísticamente significativo. Este resultado sugiere una respuesta diferencial y menos pronunciada de la SOD como mecanismo de defensa celular en comparación con la GSH. Arora y col. (2009) tampoco observaron cambios estadísticamente significativos en la actividad de la SOD tras el tratamiento con AgNPs (7-20 nm) en fibroblastos. Por el contrario, en el caso de células primarias hepáticas, observaron un incremento en la actividad de la SOD. En estudios *in vivo* en ratones tratados con AgNPs (10 nm) se observó una ligera disminución de la actividad de la SOD dosis dependiente a las concentraciones de 5, 50 y 250 mg/kg, sin embargo tras el tratamiento con 500 mg/kg la actividad de la SOD incrementó significativamente (Ranjbar y col., 2014).

En definitiva, los resultados presentados en este trabajo de investigación demuestran que las AgNPs de 4.7 y 42 nm alteraron el sistema de defensa antioxidante de las células HepG2, HL-60, NHDF y HPF, induciendo la producción de las EROs, agotando los niveles de moléculas antioxidantes (GSH) y reduciendo ligeramente la actividad de enzimas antioxidantes (SOD).

#### V.4.2. Apoptosis

La apoptosis se ha descrito como el principal mecanismo de muerte celular causada por el estrés oxidativo inducido por las NPs (Hsin y col., 2008; Eom y Choi, 2010). Este proceso ocurre como un mecanismo de defensa cuando las células están dañadas, especialmente

cuando el daño mediado por la enfermedad o el agente tóxico afecta al ADN celular, y los mecanismos de reparación celular son incapaces de hacer frente a la lesión (Kim y Ryu, 2013). En la apoptosis o muerte celular programada, las células destinadas a morir activan las enzimas que degradan su propio ADN nuclear, además de proteínas nucleares y citoplásmicas. Las enzimas proteolíticas como las caspasas son importantes moléculas efectoras en la apoptosis. La activación de las caspasas en respuesta a tóxicos ambientales puede iniciarse mediante la vía extrínseca (receptor de membrana) o la vía intrínseca (mitocondria) (Franco y col., 2009; Cullen y Martín, 2009). La vía intrínseca desempeña un papel importante en la muerte celular inducida por NP metálicas, ya que las mitocondrias son uno de los principales orgánulos diana de las EROs inducidas por NPs (Ma y Yang, 2016). Los altos niveles de las EROs en las mitocondrias pueden producir daños a los fosfolípidos de la membrana que inducen la despolarización de la membrana mitocondrial (Guo y col., 2013). En el presente trabajo de investigación seleccionamos las células HepG2 y HL-60 para evaluar la inducción de apoptosis por las AgNPs de 4.7 y 42 nm. Ambas líneas celulares han sido utilizadas en muchos estudios *in vitro* para caracterizar la muerte celular programada, ya que ambas expresan las enzimas del metabolismo celular (Terasaka y col., 2005; Nair y col., 2014; Fan y col., 2014).

Para la detección y cuantificación de la apoptosis inducida por las AgNPs de 4.7 y 42 nm en las líneas celulares HepG2 y HL-60 hemos empleado una variedad de métodos analíticos. La apoptosis es un proceso dinámico en el cual la célula presenta distintas características morfológicas y bioquímicas dependiendo del momento en el que se encuentre. Esto permite disponer de diferentes “marcadores”, aunque no todos están presentes en las diferentes líneas celulares ni tampoco son exclusivos de este proceso. Por este motivo y para evitar errores en la detección de la apoptosis se recomienda la utilización de dos o más técnicas (Gómez-Lechón y col., 2002; Morgan, 2005). Además, es necesario considerar otros aspectos como el momento en el que se producen estos cambios morfológicos o bioquímicos (tempranos o tardíos), su duración o el nivel de detección (célula individual o población celular). Así, en este trabajo de investigación hemos empleado los siguientes métodos: (i) Microscopía de fluorescencia utilizando colorantes vitales como el Hoechst 33342 más bromuro de etidio para estudiar la condensación de la cromatina, (ii) Citometría de flujo para detectar la exposición de la fosfatidilserina (FS) (ensayo Anexina V/PI), la degradación del ADN (método TUNEL) y la actividad de las caspasas.

Con el fin de seleccionar las concentraciones adecuadas para estos estudios utilizamos la microscopía de fluorescencia. El examen al microscopio de fluorescencia, nos permitió observar en ambas líneas celulares las características morfológicas propias de apoptosis, tales como la condensación de la cromatina y la formación de los cuerpos apoptóticos (**Figura 1, artículo 7**) a las concentraciones de 1,68-3,36  $\mu\text{g/ml}$  (HepG2) y 3,36-6,72  $\mu\text{g/ml}$  (HL-60) con las AgNPs de 4.7 nm y 25-50  $\mu\text{g/ml}$  (HepG2) y 150-200  $\mu\text{g/ml}$  (HL-60) con las AgNPs de 42 nm tras 24 horas de incubación. La microscopía de fluorescencia es una técnica rápida y económica, ampliamente utilizada para determinar la inducción de apoptosis (Solhaug y col., 2004; Ulukaya y col., 2011). Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes: es altamente cualitativa, subjetiva a la capacidad del investigador en cuanto a la observación y detección, y el tiempo del ensayo es limitado (cuando los cambios morfológicos son máximos) (Haza y col., 2000).

La citometría de flujo es una técnica actual que determina dos tipos de propiedades celulares, las intrínsecas, que son aquellas que podemos medir sin necesidad de añadir fluorocromos, como pueden ser el tamaño o la granularidad, y las extrínsecas, como la medición de la exposición de la FS o la degradación del ADN, que precisan de la adición de un fluorocromo. Además, los principios en los que se basa esta técnica no son complicados. Una suspensión de células convenientemente procesada y teñida con fluorocromos, se inyecta en la cámara del citómetro de flujo. Las células de la muestra atraviesan de forma individual y sucesiva esta cámara e interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática. La excitación de los fluorocromos en el punto de interacción entre la célula y el haz lumínico da lugar a la emisión de una luz de longitud de onda superior a la incidente. Esta señal es procesada por un ordenador y nos permite efectuar el análisis de la muestra. Las ventajas que proporciona la citometría de flujo frente a otros métodos que emplean fluorocromos incluyen la objetividad y la elevada sensibilidad, ya que permite el análisis individual y cuantitativo de un gran número de células en un corto periodo de tiempo (Wlodkowic y col., 2009). Las desventajas y limitaciones son los altos costes de instrumentación y la incapacidad de visualizar las células que estamos analizando.

La citometría de flujo se ha utilizado en este estudio para detectar (i) la exposición de la FS mediante el ensayo de Anexina V/IP en la línea celular HL-60, (ii) la degradación del ADN mediante el método TUNEL en las líneas celulares HepG2 y HL-60 y (iii) la actividad de las caspasas 3 y 7, tras la incubación con las AgNPs de 4.7 y 42 nm. El ensayo Anexina

V/IP se ha empleado únicamente en la línea celular HL-60, puesto que su uso en células adherentes como las HepG2 se considera poco fiable y no está recomendado. Esto se debe a que los tratamientos empleados para el desprendimiento de las células adherentes, como la tripsinización, aumentan el porcentaje de células positivas a la Anexina V y generan, por tanto, errores en la cuantificación de la apoptosis (Zamai y col., 2001). La exposición de la FS en la cara externa de la membrana celular se produce sólo en los estadios tempranos o intermedios del proceso apoptótico, previamente a otros eventos celulares como la degradación del ADN, por lo que se considera un marcador temprano de apoptosis (Akiyama y col., 1999; Balasubramanian y col., 2007; Lee y col., 2013). Sin embargo, este método presenta el inconveniente de no diferenciar las células apoptóticas tardías, en las que la integridad de la membrana celular está comprometida, de las células necróticas. Por esta razón, utilizamos también el método TUNEL, el más sensible y específico hasta el momento, para la detección de la apoptosis en ambas líneas celulares. Esta técnica detecta la degradación del ADN, biomarcador del proceso apoptótico (Kyrylkova y col., 2012), y permite por tanto diferenciar las células apoptóticas tardías de las necróticas.

La **Figura 2 (Artículo 7)** muestra que la exposición de la FS en las células HL-60 comenzó a las 17 horas de tratamiento con las AgNPs de 4.7 nm (3,36-6,72 µg/ml) y aumentó progresivamente en las 7 horas posteriores de incubación. Con el tratamiento de las AgNPs de 42 nm (150-200 µg/ml) fue a las 24 horas cuando se observó la exposición de la FS en las células. Así, el mayor aumento en el número de células HL-60 apoptóticas se produjo tras 24 horas de incubación con 6,72 µg/ml de AgNPs de 4.7 nm (60.1%) (**Figura 2 A**) y a las 48 horas de incubación con 200 µg/ml de AgNPs de 42 nm (64.4%) (**Figura 2 B**). En contraste, fue necesario aumentar el período de incubación de las AgNPs hasta 72 horas para detectar un porcentaje elevado de células HL-60 apoptóticas mediante el método TUNEL (**Figura 4, artículo 7**). El tratamiento de las células HL-60 durante 72 horas con 6,72 µg/ml de AgNPs de 4.7 nm aumentó el porcentaje de células apoptóticas hasta un 76.2% (**Figura 4 A**), mientras que con las AgNPs de 42 nm se observó un máximo de un 38% de células apoptóticas a las 72 horas de incubación con 200 µg/ml (**Figura 4 B**).

En la línea celular HepG2, tras el tratamiento con 3,36 µg/ml de AgNPs de 4.7 nm durante 48 horas se detectó un 34% de células apoptóticas, aumentando hasta alcanzar un 51.6% a las 72 horas de incubación, utilizando el método TUNEL (**Figura 3 A, artículo 7**). En los tratamientos con las AgNPs de 42 nm, el porcentaje de células apoptóticas fue



máximo tras 48 y 72 horas de incubación con 50  $\mu\text{g/ml}$  (76.5% y 78.5%, respectivamente) (**Figura 3 B, artículo 7**).

Los resultados obtenidos con el método TUNEL indican que la degradación del ADN (cambio bioquímico asociado al proceso apoptótico) en las células HepG2 (**Figura 3, artículo 7**) y HL-60 (**Figura 4, artículo 7**) tras el tratamiento con ambas AgNPs, tiene lugar a partir de las 48 horas de incubación. En general, con el microscopio de fluorescencia los cambios morfológicos se observaron en ambas líneas celulares tras 24 horas de incubación. En la bibliografía existente, otros autores han descrito que los cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis celular no se producen simultáneamente. Según Willingham (1999) no existe ninguna razón para asumir que los cambios morfológicos producidos en el núcleo de la célula durante el proceso apoptótico (p.e. la condensación de la cromatina) y los cambios bioquímicos (p.e. la degradación del ADN), puedan ser detectados en el mismo momento.

En definitiva, los resultados obtenidos con la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo confirman que las AgNPs de 4.7 y 42 nm inducen apoptosis en las células HepG2 y HL-60 dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. Además, en nuestro estudio las AgNPs de 4.7 nm mostraron un efecto apoptótico mayor en ambas líneas celulares. Tras 72 horas de incubación con las AgNPs de 4.7 nm a una concentración de 3,36  $\mu\text{g/ml}$  (HepG2) y de 6,72  $\mu\text{g/ml}$  (HL-60) el porcentaje de células apoptóticas superó el 50%, mientras que fue necesario incrementar las dosis de las AgNPs de 42 nm a 25  $\mu\text{g/ml}$  (HepG2) y 200  $\mu\text{g/ml}$  (HL-60) para obtener un porcentaje de apoptosis similar (**Figura 3 y 4, artículo 7**). Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en los estudios de citotoxicidad (MTT y LDH) (**Apartado V.2.**) donde las AgNPs de menor tamaño (4.7 nm) fueron más citotóxicas que las AgNPs de 42 nm. Park y col. (2011a) y Kumar y col. (2015) también observaron mayores efectos apoptóticos tras el tratamiento con las AgNPs más pequeñas (4 y 10 nm, respectivamente) en comparación con las AgNPs de mayor tamaño (20, 70, 100 y 200 nm) en macrófagos y fibroblastos L-929, respectivamente, utilizando el ensayo Anexina V/IP. Numerosos estudios han descrito efectos apoptóticos similares en otras líneas celulares, incluyendo células NIH3T3 de ratón, preosteoblastos de ratón, células musculares y células de colon (Hsin y col., 2008; Kim y col., 2012).

La regulación de los productos génicos relacionados con la apoptosis puede estar alterada en las células tratadas con AgNPs. Entre estos productos se encuentra el gen supresor de tumores p53, la activación del gen p53 por daño en el ADN provoca la detención del ciclo celular y la inducción de apoptosis. La activación del p53 inducida por las AgNPs se ha observado en los fibroblastos de ratón NIH3T3, fibroblastos embrionarios, células madre embrionarias, células de riñón y células de cáncer de colon y mama humanas (Hsin y col., 2008; Ahamed y col., 2008; Gopinath y col., 2010; Gurunathan y col., 2015b). Sin embargo, estudios recientes han determinado lo contrario, es decir que la apoptosis inducida por las AgNPs es independiente de la activación del p53 (Kovacs y col., 2016). Por otra parte, en otros trabajos de investigación se ha observado la disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2 o un aumento de la expresión de productos génicos proapoptóticos como Bax y Bad en células humanas y animales tratadas con AgNPs (Gopinath y col., 2010; Piao y col., 2011; Mishra y col., 2012; Baharara y col., 2015). Además, el tratamiento de las AgNPs estimuló la liberación del citocromo c y la translocación de Bax en las mitocondrias de las células NIH3T3, lo que indica que las AgNPs activaron la vía apoptótica mitocondrial (Hsin y col., 2008). El aumento de la expresión de la caspasa -9, que es activada por el citocromo c liberado de la mitocondria en las células apoptóticas, se observó también en células de hígado humano (Piao y col., 2011). A la luz de estos hallazgos, no es sorprendente que la activación de la caspasa -3, una molécula crucial en ambas vías de inducción de apoptosis, se encuentre activada en células humanas y animales tratadas con AgNPs (Arora y col., 2009; Jain y col., 2009; Sanpui y col., 2011; Jeyaraj y col., 2013; Gurunathan y col., 2015b; Baharara y col., 2015; Ma y col., 2015).

Las caspasas son enzimas proteolíticas que se activan en respuesta a señales pro-apoptóticas, como el estrés o el daño celular. Las caspasas activas consisten en dos subunidades grandes (20 kDa) y dos pequeñas (10 kDa) que se asocian de manera no covalente para formar un heterotetramero, con dos sitios activos de catálisis (Fuentes-Prior y Salvesen, 2004). Una vez activas, las caspasas escinden los sustratos específicos que incluyen proteínas citosólicas y nucleares (Elmore, 2007). Las caspasas de mamífero desempeñan papeles distintos tanto en la apoptosis como en la inflamación, existiendo tres categorías: (i) caspasas iniciadoras (-2, -8, -9, -10) que regulan la apoptosis, (ii) caspasas efectoras (-3, -6, -7) que son las responsables de las escisiones proteolíticas que conducen a la muerte celular, siendo la caspasa -3 la principal efectora y por último (iii) caspasas inflamatorias (-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) que participan en los procesos de activación de las citoquinas.

Para determinar la implicación de las caspasas en el proceso de apoptosis inducido por las AgNPs en las células HepG2 y HL-60, empleamos un inhibidor fluorescente específico (FLICA) de las caspasas -3 y -7 utilizando el citómetro de flujo. Los reactivos FLICA han sido utilizados ampliamente para realizar estudios de apoptosis utilizando la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia (Amstad y col., 2001; Dorsey y col., 2002; Hussain y col., 2014). Como se observa en la **Figura 5 A y 5 B (Artículo 7)**, las células HepG2 tratadas con 1,68 y 3,36  $\mu\text{g/ml}$  de AgNPs de 4.7 nm y, 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de AgNPs de 42 nm durante 24 horas mostraron un alto porcentaje de células con caspasas -3 y -7 activadas (49.4-57.1% con AgNPs 4.7 nm y 61.4-80.9% con AgNPs 42 nm, respectivamente) en comparación con el control de células sin tratamiento (10% de células con caspasas activadas). El tratamiento de las células HL-60 con las AgNPs de 4.7 nm a las concentraciones de 3,36 y 6,72  $\mu\text{g/ml}$  también evidenció un alto porcentaje de células con caspasas activadas (36.1% y 76.2%) (**Figura 6 A, artículo 7**). Sin embargo, el tratamiento de las células HL-60 con 150 y 200  $\mu\text{g/ml}$  de AgNPs de 42 nm aunque presentó un porcentaje de células con caspasas activadas superior al control celular, no llegó a superar el 34% de la población celular (**Figura 6 B, artículo 7**). Una vez más el tratamiento con las AgNPs de 4.7 nm en ambas líneas celulares presentó un porcentaje de células con caspasas activadas superior al de las células tratadas con AgNPs de 42 nm, por tanto se confirma que el tamaño de las AgNPs es una de las propiedades que más influye en su toxicidad.

Por otra parte, la línea celular HL-60 mostró una mayor resistencia a la inducción de apoptosis por las AgNPs de 4.7 y 42 nm que la línea celular HepG2, ya que se necesitaron concentraciones más altas para obtener porcentajes de apoptosis similares (**Figuras 3, 4, 5 y 6, artículo 7**). Estos resultados coinciden con los obtenidos en los estudios de citotoxicidad (MTT y LDH) donde las células HepG2 fueron las más sensibles a los tratamientos con ambas AgNPs.

El presente trabajo de investigación demuestra que las AgNPs de 4.7 y 42 nm inducen apoptosis dosis, tiempo y tamaño dependiente en dos líneas tumorales humanas, HepG2 y HL-60, utilizando varias técnicas analíticas, tales como la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo. Además la apoptosis inducida por ambas AgNPs es dependiente de la activación de las caspasas en las dos líneas celulares.

## CAPÍTULO VI

### *Conclusiones - Conclusions*



1. Las AgNPs de 4.7 y 42 nm en solución acuosa presentan una morfología esférica y conservan su tamaño primario. Sin embargo, cuando se incuban en medio de cultivo celular ambas AgNPs forman aglomerados incrementando su tamaño secundario hasta 100-200 nm.
2. Las AgNPs de 4.7 y 42 nm disminuyen la viabilidad de las líneas celulares HepG2, HL-60, NHDF y HPF, reduciendo la actividad mitocondrial y aumentando la permeabilidad de la membrana celular. Las NPs de menor tamaño son 40 (HepG2), 44 (HL-60), 400 (NHDF) y 149 (HPF) veces más citotóxicas que las grandes, y de las cuatro líneas celulares utilizadas las células HepG2 son las más sensibles al tratamiento con ambas AgNPs.
3. Las AgNPs de 4.7 y 42 nm son genotóxicas *in vitro*, causando ruptura de las cadenas y daño oxidativo (oxidación de purinas y pirimidinas) al ADN en todas las líneas celulares estudiadas. Además, las AgNPs de 4.7 nm son las más genotóxicas y las células HPF las más resistentes a la oxidación del ADN.
4. Las AgNPs de 4.7 y 42 nm no muestran genotoxicidad *in vivo*, es decir no presentan actividad mutagénica o recombinogénica detectable. Sin embargo, ambas AgNPs inducen defectos en la pigmentación de la cutícula y reducen la capacidad de movimiento de las moscas adultas, sugiriendo una respuesta frente al estrés oxidativo.
5. El mecanismo principal de toxicidad de las AgNPs de 4.7 y 42 nm *in vitro* es el estrés oxidativo, ya que ambas NPs agotan los niveles de GSH, reducen ligeramente la actividad de la SOD, incrementan la producción de las EROs e inducen apoptosis dependiente de caspasas. Además, la NAC reduce considerablemente la citotoxicidad de las AgNPs.
6. Las AgNPs más pequeñas producen más EROs y apoptosis. Las células HPF son las más resistentes al estrés oxidativo y las HL-60 a la inducción de apoptosis.
7. Finalmente, el tamaño de las AgNPs juega un papel fundamental en la citotoxicidad, genotoxicidad *in vitro*, producción de las EROs y en la inducción de apoptosis.

1. AgNPs of 4.7 and 42 nm have a spherical morphology and retain their primary size in aqueous solution. However, when they are incubated in cell culture medium, both AgNPs form agglomerates increasing their secondary size to 100-200 nm.
2. AgNPs of 4.7 and 42 nm decrease the viability of HepG2, HL-60, NHDF and HPF cell lines, reducing mitochondrial activity and increasing cell membrane permeability. The smaller NPs are 40 (HepG2), 44 (HL-60), 400 (NHDF) and 149 (HPF) times more cytotoxic than large NPs, and of the four cell lines used HepG2 cells are the most sensitive to treatment with both AgNPs.
3. AgNPs of 4.7 and 42 nm are genotoxic *in vitro*, causing chain breakage and oxidative damage (oxidation of purines and pyrimidines) to DNA in all cell lines studied. In addition, AgNPs of 4.7 nm are the most genotoxic and HPF cells are the most resistant to DNA oxidation.
4. AgNPs of 4.7 and 42 nm do not show genotoxicity *in vivo*, they do not exhibit detectable mutagenic or recombinogenic activity. However, both AgNPs induce defects in cuticle pigmentation and reduce the movement capacity of adult flies, suggesting a response to oxidative stress.
5. The main mechanism of toxicity of 4.7 and 42 nm AgNPs *in vitro* is oxidative stress, since both NPs deplete GSH levels, slightly reduce SOD activity, increase ROS production, and induce caspase-dependent apoptosis. In addition, NAC significantly reduces the cytotoxicity of AgNPs.
6. Smaller AgNPs produce more ROS and apoptosis. HPF cells are the most resistant to oxidative stress and HL-60 to induction of apoptosis.
7. Finally, the size of AgNPs plays a fundamental role in cytotoxicity, genotoxicity *in vitro*, production of ROS and in the induction of apoptosis.

## CAPÍTULO VII

### *Bibliografía*





- Abbasi, E., Aval, S.F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H.T., Joo, S.W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., Pashaei-Asl, R., 2014. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* 9 (1), 247.
- Abdelhalim, M.A.K., Mady, M.M., Ghannam, M.M., 2012. Physical properties of different gold nanoparticles: Ultraviolet-visible and fluorescence measurements. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 3, 3.
- Adeyemi, O.S., Sulaiman, F.A., 2012. Biochemical and morphological changes in *Trypanosoma brucei brucei*-infected rats treated with homidium chloride and diminazene aceturate. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 23 (4), 179-183.
- AESAN, 2009. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso de la nanotecnología en la industria alimentaria. AESAN-2009-014. Disponible en:  
[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/NANOTECONOLOGIA\\_I.ALIMENTARIA.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/NANOTECONOLOGIA_I.ALIMENTARIA.pdf)
- Aguilar, M.A., 2009. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum Gloesporioides*. Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clin. Chim. Acta.* 383, 57-64.
- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Hong, Y., 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 404-410.
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T.J., Nielsen, M., Hussain, S.M., Rowe, J.J., 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 263-269.
- Akiyama, H., Suzuki, K., Ino, T., Kadsuda, I., Hirano, M., 1999. Evaluation of cytarabine-induced apoptosis in leukemic cell lines; utility of annexin V method. *Rinsho. Biory* 47, 774-779.
- Alaraby, M., Demir, E., Hernández, A., Marcos, R., 2015. Assessing potential harmful effects of CdSe quantum dots by using *Drosophila melanogaster* as in vivo model. *Sci. Total Environ.* 530-531, 66-75.
- Alarifi, S., Ali, D., Al-Bishri, W., 2016. In vitro apoptotic and DNA damaging potential of nanobarium oxide. *Int. J. Nanomedicine* 11, 249-257.

- Amenta, V., Aschberger, K., Arena, M., Bouwmeester, H., Moniz, F.B., Brandhoff, P., Gottardo, S., Marvin, H.J.P., Mech, A., Pesudo, L.Q., Rauscher, H., Schoonjans, R., Vettori, M.V., Weigel, S., Peters, R.J., 2015. Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 463-476.
- Amstad, P.A., Yu, G., Johnson, G.L., Lee, B.W., Dhawan, S., Phelps, D.J., 2001. Detection of Caspase Activation In Situ by Fluorochrome-Labeled Caspase Inhibitors. *BioTechniques* 31, 608-616.
- Anghel, I., Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Fikai, A., Anghel, A.G., Chifiriuc, M.C., 2013. Biohybrid nanostructured Iron oxide nanoparticles and *Satureja hortensis* to prevent fungal biofilm development. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 18110-18123.
- Arivalagan, K., Ravichandran, S., Rangasamy, K., Karthikeyan, E., 2011. Nanomaterials and its potential applications. *Int. J. ChemTech. Research CODEN( USA)* 3 (2), 534-538.
- Armstrong, N., Ramamoorthy, M., Lyon, D., Jones, K., Duttaroy, A., 2013. Mechanism of silver nanoparticles action on insect pigmentation reveals intervention of copper homeostasis. *PLoS One* 8 (1), e53186.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett.* 179, 93–100.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., 2009. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 310–318.
- Arora, S., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., 2012. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 151–165.
- Asare, N., Istanes, C., Sandberg, W.J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., Brunborg, G., 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 291 (1-3), 65-72.
- Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Klüttgen, B., Christensen, F.M., 2011. Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health — Lessons learned from four case studies. *Environ. Int.* 37 (6), 1143–1156.
- Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, S., 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19, 255102.
- Asharani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279-290.

- Asharani, P.V., Lianwu, Y., Gong, Z., Valiyaveetil, S., 2011. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology* 5, 43-54.
- Athinarayanan, J., Periasamy, V.S., Alsaif, M.A., Al-Warthan, A.A., Alshatwi, A.A., 2014. Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell. Biol. Toxicol.* 30 (2), 89-100.
- Auffan, M., Rose, J., Roncato, M.A., Chaneac, C., Waite, D.T., Masion, A., Woicik, J.C., Wiesner, M.R., Bottero, J.Y., 2008. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6730–6735.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.P., Wiesner, M.R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* 4 (10), 634-641.
- Baeza-Squiban, S., Lanone, A., 2011. Exposure, Uptake, and Barriers. Nanoethics and Nanotechnology. P. Houdy, M. Lahmani, F. Marano, eds. (Springer Berlin Heidelberg), 37–61.
- Baharara, J., Namvar, F., Ramezani, T., Mousavi, M., Mohamad, R., 2015. Silver nanoparticles biosynthesized using *Achillea biebersteinii* flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of Bax and Bcl-2 gene expression. *Molecules* 20 (2), 2693-2706.
- Baker, R.T., Bernal, S., Calvino, J.J., Perez-Omil, J.A., Lopez-Cartes, C., 2004. Nanotechnology in catalysis. Zhou, B., Hermans, S., Somorjai, G.A. (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 403-426 24 p.
- Baker, S.E., Sawvel, A.M., Fan, J., Shi, Q., Strandwitz, N.C., Stucky, G.D., 2008. Blood clot initiation by mesocellular foams: dependence on nanopore size and enzyme immobilization. *Langmuir* 24, 14254–14260.
- Balasubramanian, K., Mirnikjoo, B., Schroit, A.J., 2007. Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282 (25), 18357-18364.
- Barati A., 2010. Nano-Composite Superabsorbent Containing Fertilizer Nutrients Used in Agriculture. U.S. patent application publication. Pub. No.: US 2010/0139347 A1.

- Barillet, S., Jugan, M.L., Laye, M., Leconte, Y., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., Carrère, M., 2010. In vitro evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: cytogenotoxicity and oxidative stress. *Toxicol. Lett.* 198, 324–330.
- Bartłomiejczyk, T., Lankoff, A., Kruszewski, M., Szumiel, I., 2013. Silver nanoparticles-allies or adversaries?. *Ann. Agric. Environ. Med.* 20 (1), 48-54.
- Behera, S., Debata, A., Nayak, P.L., 2011. Biomedical applications of silver nanoparticles. *J. Asian Sci. Res.* 1, 27-56.
- Berekaa, M.M., 2015. Nanotechnology in Food Industry; Advances in Food processing, Packaging and Food Safety. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4 (5), 345-357.
- Berne, B.J., Pecora, R., 2000. Dynamic Light Scattering. Courier Dover Publications. ISBN 0-486-41155-9.
- BiPRO, Öko-Institut, 2013. Study of the scope of a Belgian national register for nanomaterials and products containing nanomaterials. Munich, Federal Public Service health, Food Chain Safety and Environment, Brussels. Disponible en: [www.health.belgium.be/.../BE%20Nano%20Register%20Report\\_final.pdf](http://www.health.belgium.be/.../BE%20Nano%20Register%20Report_final.pdf).
- Bopp, S.K., Lettieri, T., 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol.* 8, 8.
- Borm, P., Klaessig, F.C., Landry, T.D., Moudgil, B., Pauluhn, J., Thomas, K., Trottier, R., Wood, S., 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicol. Sci.* 90 (1), 23-32.
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M., Hagens, W., Bulder, A., de Heer, C., ten Voorde, S.E., Wijnhoven, S., Marvin, H.J., Sips, A., 2009. Health impact of nanotechnologies in food production. Institute of food safety (RIKILT) y National institute for public health & the environment (RIVM). Report 2007.014.
- Bouwmeester, H., Brandhoff, P., Marvin, H.J.P., Weigel, S., Peters, R.J.B., 2014. State of the safety assessment and current use of nanomaterials in food and food production. *Trends Food Sci. Technol.* 40 (2), 200–210.
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J., Hofmann, M.C., 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian stem cells. *Toxicol. Sci.* 88, 412-419.
- Braydich-Stolle, L.K., Lucas, B., Schrand, A., Murdock, R.C., Lee, T., Schlager, J.J., Hussain, S.M., Hofmann, M.C., 2010. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol. Sci.* 116 (2), 577-589.

- Brisson, J.A., De Toni, D.C., Duncan, I., 2005. Abdominal pigmentation variation in *Drosophila polymorpha*: geographic variation in the trait, and underlying phylogeography. *Evolution* 59, 1046–1059.
- Brody, A.L., Bugusu, B., Han, J.H., Sand, C.K., McHugh, T.H., 2008. Scientific status summary. Innovative food packaging solutions. *J. Food Sci.* 73, 107–116.
- Brown, T., Smith, D., 1976. The effects of silver nitrate on the growth and ultrastructure of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Microbios Lett.* 3, 155–162.
- Burczynski, M.E., Penning, T.M., 2000. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon orthoquinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* 60, 908–915.
- Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B.* 112, 13608–13619.
- Carrero-Sanchez, J.C., Elías, A.L., Mancilla, R., Arrellín, G., Terrones, H., Laclette, J.P., Terrones, M., 2006. Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. *Nano Lett.* 6 (8), 1609–1616.
- Carrola, J., Bastos, V., Jarak, I., Oliveira-Silva, R., Malheiro, E., Daniel-da-Silva, A.L., Oliveira, H., Santos, C., Gil, A.M., Duarte, I.F., 2016. Metabolomics of silver nanoparticles toxicity in HaCaT cells: structure-activity relationships and role of ionic silver and oxidative stress. *Nanotoxicology* 4, 1–13.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., Linse, S., 2007. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (7), 2050–2055.
- Cha, K., Hong, H.W., Choi, Y.G., Lee, M.J., Park, J.H., Chae, H.K., Ryu, G., Myung, H., 2008. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol. Lett.* 30 (11), 1893–1899.
- Chairuangkitti, P., Lawanprasert, S., Roytrakul, S., Aueviriyavit, S., Phummiratch, D., Kulthong, K., Chanvorachote, P., Maniratanachote, R., 2013. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol. In Vitro* 27, 330–338.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S., 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 323–333.

- Chang, A.L.S., Khosravi, V., Egbert, B., 2006. A case of argyria development after colloidal silver digestion. *J. Cutan. Pathol.* 33, 809-811.
- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R., Watkins R., 2008. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit. Contam. Part. A. Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 25, 241-258.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fang, X., Ma, B., Wan, L., 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol. Lett.* 163 (2), 109-120.
- Chen, C., Chiang, C., 2008. Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Mater. Lett.* 62, 3607-3609.
- Chen, P.C., Mwakwari, S.C., Oyelere, A.K., 2008. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 1, 45-65.
- Chen, X., Schluesener, H.J., 2008. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicol. Lett.* 176, 1-12.
- Chen, L., Zheng, L., Lv, Y., Liu, H., Wang, G., Ren, N., Liu, D., Wang, J., Boughton, R.I., 2010. Chemical assembly of silver nanoparticles on stainless steel for antimicrobial applications. *Surf. Coat. Technol.* 204, 3871-3875.
- Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake by mammalian cells. *Nano Lett.* 7, 1542-1550.
- Cho, W., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H.Y., Han, B.S., Kim, S.H., Kim, H.O., Lim, Y.T., Chung, B.H., Jeong, J., 2009. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 16-24.
- Choi, Y., No, N.H., Tung, C., 2007. Sensing phosphatase activity by using gold nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 707-709.
- Choi, J., Reipa, V., Hitchins, V.M., Goering, P.L., Malinauskas, R.A., 2011. Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 123, 133-143.
- Cohen, M.S., Stern, J.M., Vanni, A.J., Kelley, R.S., Baumgart, E., Field, D., Libertino, J.A., Summerhayes, I.C., 2007. In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surg. Infect.* 8, 397-403.
- Comisión Europea, 2009. Reglamento (CE) nº 450/2009 de 29 de mayo de 2009, sobre los materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea* L135, 3-11.

- Comisión Europea, 2011a. Recomendación de la Comisión de 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial. *Diario Oficial de la Unión Europea* L275, 38-40.
- Comisión Europea, 2011b. Reglamento (UE) nº 10/2011 de 14 de enero de 2011, sobre los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea* L12 (1), 1-89.
- Comisión Europea, 2012. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo y al Comité Económico y Social Europeo sobre la segunda revisión reglamentaria de los nanomateriales, incluidos los aspectos de seguridad. COM (2012) 572 final, SWD (2012) 288 de 3.10.2012. Bruselas: Comisión Europea.
- Comisión Europea, 2013. Grafeno y el proyecto Cerebro humano ganan el premio más importante de la historia en el campo de la investigación, mientras sigue la batalla por una financiación continua de la ciencia. Comunicado de prensa en Bruselas el 28 de enero de 2013. IP/13/54.
- Corbett, J., McKeown, P.A., Peggs, G.N., Whatmore, R., 2000. Nanotechnology: International Developments and Emerging Products. *CIRP Annals – Manufac. Techn.* 49 (2), 523–545.
- Cornejo, K., 2014. La nanotecnología orientada a los sistemas convencionales. Disponible en: <http://khaterinecornejoguzman.blogspot.com.es/2014/09/la-nanotecnologia-orientada-los.html>.
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M.O., Burgos-Hernández, A., Ezquerro-Brauer, J., Plascencia-Jatomea, M., 2013. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: Development of new strategies for microbial control in agriculture. *J. Sci. Food Agric.* 93, 1525-1536.
- Cullen, S.P., Martin, S.J., 2009. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ.* 16, 935–938.
- Danish Ministry of the Environment. Environmental Protection Agency, 2015. Exposure assessment of nanomaterials in consumer products. Environmental Project No. 1636.
- De Azeredo, M.C.H., 2013. Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 30, 56–69.
- De Jong, W.H., Hagens, W.I., Krystek, P., Burger, M.C., Sips, A.J.A.M., Geertsma, R.E., 2008. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29, 1912-1919.



- De Lima, R., Seabra, A.B., Durán, N., 2012. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 32 (11), 867-79.
- Debatin, K.M., Krammer, P.H., 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23, 2950–2966.
- Decan, N., Wu, D., Williams, A., Bernatchez, S., Johnston, M., Hill, M., Halappanavar, S., 2016. Characterization of in vitro genotoxic, cytotoxic and transcriptomic responses following exposures to amorphous silica of different sizes. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 796, 8-22.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Meth.* 15, 61-69.
- Demir, E., Vales, G., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2011. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Nanotoxicology* 5, 417-424.
- Denman, C.J., McCracken, J., Hariharan, V., Klarquist, J., Oyarbide-Valencia, K., Guevara-Patino, J.A., Le Poole, I.C., 2008. HSP70i accelerates depigmentation in a mouse model of autoimmune vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 128 (8), 2041-2048.
- Des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schanaider, Y.J., Preat, V., 2006. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J. Control. Release.* 116 (1), 1-27.
- Di Bucchianico, S., Fabbri, M.R., Misra, S.K., Valsami-Jones, E., Berhanu, D., Reip, P., Bergamaschi, E., Migliore, L., 2013. Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. *Mutagenesis* 28 (3), 287-99.
- Díaz, B., Sánchez-Espinel, C., Arruebo, M., Faro, J., de Miguel, E., Magadán, S., Yagüe, C., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M.R., Santamaría, J., González-Fernández, A., 2008. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small* 4, 2025–2034.
- Doak, S.H., Manshian, B., Jenkins, G.J., Singh, N., 2012. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutat. Res.* 745, 104–111.
- Domingos, R.F., Baalousha, M.A., Ju-Nam, Y., Reid, M.M., Tufenkji, N., Lead, J.R., Leppard, G.G., Wilkinson, K.J., 2009. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environ. Sci. Technol.* 43 (19), 7277-7284.

- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W., Borm, P.J.A., 2004. Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* 61, 727-728.
- Dorsey, J.F., Cunnick, J.M., Lanehart, R., Huang, M., Kraker, A.J., Bhalla, K.N., Jove, R., Wu, J., 2002. Interleukin-3 protects Bcr-Abl-transformed hematopoietic progenitor cells from apoptosis induced by Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia* 16 (9), 1589-1595.
- Drapeau, M.D., Radovic, A., Wittkopp, P.J., Long, A.D., 2003. A gene necessary for normal male courtship, yellow, acts downstream of fruitless in the *Drosophila melanogaster* larval brain. *J. Neurobiol.* 55 (1), 53-72.
- Dreher, K.L., 2004. Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 77, 3-5.
- Durán, N., Marcato, P.D., De Conti, R., Alves, O.L., Costab, F.T.M., Brocchib, M., 2010. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (6), 949-959.
- Dusinska, M., Fjellsbø, L.M., Magdolenova, Z., Ravnum, S., Rinna, A., Rundén-Pran, E., 2011. Safety of Nanoparticles in Medicine. In: Nanomedicine in Health and Disease. USA: *Sci. Publish.* 11, 203-226.
- Eastmond, D.A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W.A., Cimino, M.C., Dovrev, I., Douglas, G.G., Nohmi, T., Philips, D.H., Vickers, C., 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis* 24, 341-349.
- Eckhardt, S., Brunetto, P.S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., Fromm, K.M., 2013. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chem. Rev.* 113, 4708-4754.
- EFSA, 2009. European Food Safety Authority. The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety. Question No EFSA-Q-2007-124<sup>a</sup>. *EFSA Journal* 958, 1-39.
- EFSA Scientific Committee, 2011a. Scientific Opinion. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA J.* 9 (5), 2140.
- EFSA Scientific Committee, 2011b. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J.* 9 (9), 2379-2448.
- El Badawy, A., Silva, R., Morris, B., Scheckel, K., Suidan, M., Tolaymat, T., 2011. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 283-287.

- Elechiguerra, J.L., Burt, J., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H., Yacaman, M.J., 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnol.* 3, 6.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35 (4), 495–516.
- Eom, H., Choi, J., 2010. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ. Sci. Technol.* 44 (21), 8337–8342.
- EU-OSHA (European Agency for Safety and Health at Work), BAUA, Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), INSHT, CIOP-PIB., 2009. Workplace exposure to nanoparticles.
- EU-OSHA, 2014. Prioridades para la investigación sobre seguridad y salud laboral en Europa: 2013-2020. doi: 10.2802/92348.
- Faedmaleki, F., Shirazi, H.F., Salarian, A.A., Ahmadi Ashtiani, H., Rastegar, H., 2014. Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Mice Liver Primary Cell Culture and HepG2 Cell Line. *Iran J. Pharm. Res.* 13 (1), 235-242.
- Fan, H., Tian, W., Ma, X., 2014. Curcumin induces apoptosis of HepG2 cells via inhibiting fatty acid synthase. *Target Oncol.* 9 (3), 279-286.
- FAO/WHO, 2010. FAO/WHO Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications. Meeting report. Rome 2010.
- FDA, 2007. Food and Drug Administration. Nanotechnology, a report of the US. Food and Drug Administration. *Nanotechnology Task Forcé*. Rockville, Maryland. Disponible en: <http://www.fda.gov/nanotechnology/taskforce/report2007.pdf>
- FECYT, 2009. Fundación española para la ciencia y tecnología. Nanociencia y nanotecnología. Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro.
- Fenoglio, I., Corazzari, I., Francia, C., Bodoardo, S., Fubini, B., 2008. The oxidation of glutathione by cobalt/tungsten carbide contributes to hard metal-induced oxidative stress. *Free Radic. Res.* 42 (8), 737–745.
- Ferrara, G., Loffredo, E., Senesi, N., Marcos, R., 2006. Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6. *Mutat. Res.* 603 (1), 27-32.
- Flower, N.A., Brabu, B., Revathy, M., Gopalakrishnan, C., Raja, S.V., Murugan, S.S., Kumaravel, T.S., 2012. Characterization of synthesized silver nanoparticles and

- assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 742 (1-2), 61-5.
- Foladori, G., Bejarano, F., Invernizzi, N., 2013. Nanotecnología: gestión y reglamentación de riesgos para la salud y el medio ambiente en América Latina y el Caribe. *Trab. Educ. Saúde* 11 (1), 145-167.
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D.A., Hoffmann, H.J., Autrup, H., 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* 190 (2), 156-62.
- Foldbjerg, R., Dang, D.A., Autrup, H., 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch. Toxicol.* 85, 743–50.
- Foldbjerg, R., Autrup, H., 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Toxicity. *Archives of Basic and Applied Medicine* 1(1), 5-15.
- Forfás, 2010. Ireland's Nanotechnology Commercialisation Framework 2010-2014. Disponible en: [http://edepositireland.ie/bitstream/handle/2262/70645/forfas310810-nanotech\\_commercialisation\\_framework\\_2010-2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://edepositireland.ie/bitstream/handle/2262/70645/forfas310810-nanotech_commercialisation_framework_2010-2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Forough, M., Farhadi, K., 2010. Biological and green synthesis of silver nanoparticles. *Turkish. J. Eng. Env. Sci.* 34, 281–287.
- Franco, R., Sanchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat. Res.* 674 (1-2), 3-22.
- Freestone, I., Meeks, N., Sax, M., Higgitt, C., 2007. The Lycurgus cup- a roman nanotechnology. *Gold Bulletin* 40, 270-277.
- Frei, H., Würzler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297-308.
- FSAI, 2008. Food Safety Authority Of Ireland. The Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industries. *Food Additives, Chemical Contaminants & Residues*, Dublin.
- Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384 (2), 201–232.
- Furr, J.R., Russell, A.D., Turner, T.D., Andrews, A., 1994. Antibacterial activity of Actisorb Plus, Actisorb and silver nitrate. *J. Hosp. Infect.* 27, 201-208.
- Gaiser, B.K., Hirn, S., Kermanizadeh, A., Kanase, N., Fytianos, K., Wenk, A., Haberl, N., Brunelli, A., Kreyling, W.G., Stone, V., 2013. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro. *Toxicol. Sci.* 131, 537–547.

- Galera, A., 2015. El impacto de la nanotecnología sobre la seguridad y la salud laboral. *ORP J.* 2, 31-58.
- Galvan, I., Alonso-Alvarez, C., 2009. The expression of melanin-based plumage is separately modulated by exogenous oxidative stress and a melanocortin. *Proc. Biol. Sci.* 276 (1670), 3089-3097.
- Gálvez, V., Tanarro, C., 2010. Toxicología de las nanopartículas. *Seguridad y salud en el trabajo* 56, 6-12.
- Ganapathi, A.P., Devaki, R., Thuniki, N.R., Manna, J., Tirumuru, B., Gopu, C.R., Deepthi, S.B., Trivedi, R., Rana, R.K., Hasan, A., 2014. In vitro assessment of Ag and TiO<sub>2</sub> nanoparticles cytotoxicity. *Int. J. Res. Med. Sci.* 2 (4), 1360-1367.
- García, A., Morales, P., Arranz, N., Delgado, E., Rafter, J., Haza, A.I., 2008. Induction of apoptosis and reactive oxygen species production by N-nitrosopiperidine and N-nitrosodibutylamine in human leukemia cells. *J. Appl. Toxicol.* 28, 455–465.
- García, A., Morales, P., Rafter, J., Haza, A.I., 2009. N-Nitrosopiperidine and N-Nitrosodibutylamine induce apoptosis in HepG2 cells via the caspase dependent pathway. *Cell. Biol. Int.* 33 (12), 1280-1286.
- Gautam, A., Singh, D., Vijayaraghavan, R., 2011. Dermal exposure of nanoparticles: an understanding. *J. Cell Tissue Reser.* 11 (1), 2703 -2708.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119, 493-501.
- Geiser, M., 2010. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug. Deliv.* 23, 207–217.
- Gholami-Ahangaran, M., Zia-Jahromi, N., 2013. Nanosilver effects on growth parameters in experimental aflatoxicosis in broiler chickens. *Toxicol. Ind. Health* 29 (2), 121-125.
- Ghosh, M., Manivannan, J., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S.K., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A., 2012. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat. Res.* 749, 60-69.
- Glassman, S.J., 2011. Vitiligo, reactive oxygen species and T-cells. *Clin. Sci. (Lond.)* 120 (3), 99-120.
- Gliga, A.R., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B., Karlsson, H., 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 11-28.

- Gomaa, I.O., Kader, M.H., Salah, T.A., Heikal, O.A., 2013. Evaluation of in vitro mutagenicity and genotoxicity of magnetite nanoparticles. *Drug Discov. Ther.* 7 (3), 116-123.
- Gómez-Lechón, M.J., O'Connor, E., Castell, J.C., Jover, R., 2002. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 65, 299-308.
- González, J., 2011. La revolución de la Física del carbono: fullerenos, nanotubos, grafeno. Instituto de Estructura de la Materia. XI Semana de la Ciencia de Madrid.
- Gonzalez, L., Sanderson, B.J., Kirsch-Volders, M., 2011. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis* 26, 185–191.
- Gopee, N.V., Roberts, D.W., Webb, P., Cozart, C.R., Siitonen, P.H., Warbritton, A.R., Yu, W.W., Colvin, V.L., Walker, N.J., Howard, P.C., 2007. Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice. *Toxicol. Sci.* 98, 249–257.
- Gopinath, P., Kumar, S., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A. and Ghosh, S.S., 2010. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 77, 240–245.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6 (2), 153-188.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J., Wurler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402, 203-209.
- Graveland-Bikker, J.F., de Kruif, C.C., 2006. Unique milk protein-based nanotubes: Food and nanotechnology meet. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 196-203.
- Guevara, G., Galeano, L., Flórez, A.L., 2000. Evaluación genotóxica del etopósido (VP16) en cultivos celulares estimulados con fitohemaglutinina. *Rev. Colomb. Cancerol.* 6, 23-32
- Guo, J.Z., Cui, H., Zhou, W., Wang, W., 2008. Ag nanoparticle-catalyzed chemiluminescence reaction between luminol and hydrogen peroxide. *J. Photochem. Photobiol. A.* 193 (2–3), 89–96.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., Zhang, D., 2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* 8 (21), 2003-2014.
- Gurunathan, S., Jeong, J.K., Han, J.W., Zhang, X.F., Park, J.H., Kim, J.H., 2015a. Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. *Nanoscale Res. Lett.* 10, 1–17.

- Gurunathan, S., Park, J.H., Han, J.W., Kim, J.H., 2015b. Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: Targeting p53 for anticancer therapy. *Int. J. Nanomed.* 10, 4203–4222.
- Gutiérrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., Sánchez-Granados, E., Grilo, A., Cameán, A.M., 2009. Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. *Rev. Toxicol.* 26, 87-92.
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Hagen, R., Kleinsasser, N., 2011. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol. Lett.* 201 (1), 27-33.
- Han, D.W., Woo, Y.I., Lee, M.H., Lee, J.H., Lee, J., Park, J.C., 2012. In-vivo and in-vitro biocompatibility evaluations of silver nanoparticles with antimicrobial activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12 (7), 5205-5209.
- Hannig, M., Hannig, C., 2010. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotech.* 5, 565–569.
- Haza, A.I., Glinghammar, B., Grandien, A., Rafter, J., 2000. Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr. Cancer* 36, 79-89.
- Hennes, C., Batke, M., Bomann, W., Duhayon, S., Kosemund, K., Politano, V., Stinchcombe, S., Doe, J., 2014. Incorporating potency into EU classification for carcinogenicity and reproductive toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70 (2), 457-67.
- Hillyer, J.F., Albrecht, R.M., 2001. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 90 (12), 1927–1936.
- Hilty, F.M., Knijnenburg, J.T., Teleki, A., Krumeich, F., Hurrell, R.F., Pratsinis, S.E., Zimmermann, M.B., 2011. Incorporation of Mg and Ca into nanostructured Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> improves Fe solubility in dilute acid and sensory characteristics in foods. *J. Food Sci.* 76, N2-10.
- Hoet, P.H.M., Bruske-Hohlfeld, I., Salata, O.V., 2004. Nanoparticles- Known and unknown health effects. *J. Nanobiotechnol.* 2, 12.
- Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., Iwahashi, H., 2012. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 605-619.
- Houdy, P., Lahmani, M., Marano, F., 2011. Nanoethics and Nanotoxicology. 665. Springer-Verlag Berlín Heidelberg.

- Hsin, Y.H., Chen, C.F., Huang, S., Shih, T.S., Lai, P.S., Chueh, P.J., 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 179, 130-139.
- <http://physics.about.com/cs/glossary/g/nanotechnology.htm>.
- <http://www.bourneresearch.com>
- <http://www.hyperdictionary.com/dictionary/nanotechnology>.
- <http://www.ipt.arc.nasa.gov/nanotechnology.html>.
- Huang, C., Aronstam, R.S., Chen, D., Huang, Y., 2010. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol. in Vitro* 24, 45–55.
- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J., 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro* 19, 975-983.
- Hussain S.M., Javorina A.K., Schrand A.M., Duhart H.M., Ali S.F., Schlager J. J., 2006. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol. Sci.* 92, 456–463.
- Hussain, S., Sangtian, S., Anderson, S.M., Snyder, R.J., Marshburn, J.D., Rice, A.B., Bonner, J.C., Garantziotis, S., 2014. Inflammasome activation in airway epithelial cells after multi-walled carbon nanotube exposure mediates a profibrotic response in lung fibroblasts. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 28.
- Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz, S., Brenner, C., 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807 (6), 735-745.
- INSHT, 2015. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales. Disponible en:  
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FICHAS%20DE%20PUBLICACIONES/EN%20CATALOGO/Higiene/2015%20Seguridad%20y%20salud%20en%20el%20trabajo%20con%20nanomateriales/SST%20con%20nanomateriales.pdf>
- IPC, 2013. International patent classification. Nano-structures formed by manipulation of individual atoms, molecules, or limited collections of atoms or molecules as discrete units, manufacture or treatment thereof. Subclase B82B.
- ISO, 2010. ISO nanotechnologies- Vocabulary part 1: Core terms. International Organization for Standardization, DD ISO/TS 80004-1:2010.
- Iversen, T.G., Skotland, T., Sandvig, K., 2011. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 6, 176–185.



- Jacobsen, N.R., Pojana, G., White, P., Møller, P., Cohn, C.A., Korsholm, K.S., Vogel, U., Marcomini, A., Loft, S., Wallin, H., 2008. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade mark Mouse lung epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (6), 476-87.
- Jain, P.K., Huang, X., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A., 2008. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc. Chem. Res.* 41, 1578-1586.
- Jain, J., Arora, S., Rajwade, J.M., Omray, P., Khandelwal, S., Paknikar, K.M., 2009. Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol. Pharm.* 6, 1388-1401.
- Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J., Florence, A.T., 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 821-826.
- Jerome, K.R., Chen, Z., 2000. Apoptosis in HL-60 cells and topoisomerase I in vivo. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124, 802.
- Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arun, R., MubarakAli, D., Sathishkumar, G., Sivanandhan, G., Dev, G.K., Manickavasagam, M., Premkumar, K., Thajuddin, N., Ganapathi, A., 2013. An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using *Podophyllum hexandrum* on human cervical carcinoma cells. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 102, 708-717.
- Johnston, H.J., Hutchison, G., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V., 2010. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 328-346.
- Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., Sánchez, E., Gribo, A., Camean, A.M., 2009. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol. In Vitro* 23, 1491-1496.
- Jovanovic, S.V., Simic, M.G., 1986. One-electron redox potentials of purines and pyrimidines. *J. Phys. Chem.* 90, 974-978.
- Kah, M., Beulke, S., Tiede, K., Hofmann, T., 2012. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Crit. Rev. in Environ. Sci. Technol.* 43, 1823-1867.
- Kang, T., Guan, R., Chen, X., Song, Y., Jiang, H., Zhao, J., 2013. In vitro toxicity of differentsized ZnO nanoparticles in Caco-2 cells. *Nanoscale Res. Lett.* 8 (1), 496.

- Karlsson, H.L., 2010. The comet assay in nanotoxicology research. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 651-666.
- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527-549.
- Kato, H., 2011. In vitro assays: Tracking nanoparticles inside cells. *Nat. Nanotechnol.* 6, 139-140.
- Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., Cajaraville, M.P., 2015. Mechanisms of Toxicity of Ag Nanoparticles in Comparison to Bulk and Ionic Ag on Mussel Hemocytes and Gill Cells. *PLoS One* 10 (6), e0129039.
- Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S., Ma, N., 2006. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation related carcinogenesis. *Biol. Chem.* 387, 365-372.
- Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S., 2009. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6046-6051.
- Keat, C.L., Aziz, A., Eid, A.M., Elmarzug, N.A., 2015. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioprocess.* 2, 47.
- Key, S.C., Reaves, D., Turner, F., Bang, J.J., 2011. Impacts of silver nanoparticle ingestion on pigmentation and developmental progression in *Drosophila*. *Atlas J. Biol.* 1 (3), 52-61.
- Khabour, O.F., Alawneh, K., Al-Kofahi, E., Mesmar, F., 2015. Assessment of genotoxicity associated with Behcet's disease using sister-chromatid exchange assay: vitamin E versus mitomycin C. *Cytotechnology* 67 (6), 1051-1057.
- Khanna, K.K., Jackson, S., 2001. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27, 247-254.
- Kim, Y.S., Schwabe, R.F., Qian, T., Lemasters, J.J., Brenner, D.A., 2002. TRAIL-mediated apoptosis requires NF- $\kappa$ B inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells. *Hepatology* 36, 1498-1508.
- Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Yu, I.J., 2008. Twentyeight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 20, 575-583.
- Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K., Park, K., Yi, J., Ryu, D., 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro.* 23, 1076-1084.

- Kim, H.R., Kim, M.J., Lee, S.Y., Oh, S.M., Chung, K.H., 2011. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutat. Res.* 726, 129-135.
- Kim, T.H., Kim, M., Park, H.S., Shin, U.S., Gong, M.S. and Kim, H.W., 2012. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 100 (4), 1033-43.
- Kim, S., Ryu, D.Y., 2013. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *J. Appl. Toxicol.* 33 (2), 78-89.
- Kim, Y.R., Park, J.I., Lee, E.J., Park, S.H., Seong, N.W., Kim, J.H., Kim, G.Y., Meang, E.H., Hong, J.S., Kim, S.H., Koh, S.B., Kim, M.S., Kim, C.S., Kim, S.K., Son, S.W., Seo, Y.R., Kang, B.H., Han, B.S., An, S.S., Yun, H.I., Kim, M.K., 2014. Toxicity of 100 nm zinc oxide nanoparticles: a report of 90-day repeated oral administration in Sprague Dawley rats. *Int. J. Nanomedicine* 9 (2), 109-26.
- Kisin, E.R., Murray, A.R., Keane, M.J., Shi, X.C., Schwegler-Berry, D., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Wallace, W.E., Kagan, V.E., Shvedova, A.A., 2007. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 70 (24), 2071-2079.
- Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., Eppler, M., 2010. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem. Mater.* 22, 4548-4554.
- Kittler, S., Greulich, C., Gebauer, J.S., Diendorf, J., Treuel, L., Ruiz, L., 2010. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 20, 512-518.
- Klien, K., Godnic-Cvar, J., 2012. Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on in vivo studies. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 63, 133-145.
- Knaapen, A., Seiler, F., Schilderman, P., Nehls, P., Bruch, J., Schins, R., Borm, P., 1999. Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 234-240.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620-650.
- Kokura, S., Handa, O., Takagi, T., Ishikawa, T., Naito, Y., Yoshikawa, T., 2010. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: nanotechnology. Biol. Med.* 6, 570-574.

- Kole, C., Kole, P., Manoj Randunu, K., Choudhary, P., Podila, K., Chun Ke, P., Rao, A.M., Marcus, R.K., 2013. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnol.* 13, 37.
- Kong, B., Seog, J.H., Graham, L.M., Lee, S.B., 2011. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 6 (5), 929–941.
- Kovács, D., Igaz, N., Keskeny, C., Béteky, P., Tóth, T., Gáspár, R., Madarász, D., Rázga, Z., Kónya, Z., Boros, I.M., Kiricsi, M., 2016. Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis. *Sci. Rep.* 6, 27902.
- Kreyling, H.S.W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Oberdörster, A.Z.G., 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 65 (20), 1513-1530.
- Krysko, O., de Ridder, L., Cornelissen, M., 2004. Phosphatidylserine exposure Turing early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis* 9, 495-500.
- Kumala, S., Niemiec, P., Widel, M., Hancock, R., Rzeszowska-Wolny, J., 2003. Apoptosis and clonogenic survival in three tumour cell lines exposed to gamma rays or chemical genotoxic agents. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8, 655-665.
- Kumar, G., Degheidy, H., Casey, B.J., Goering, P.L., 2015. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.* 85, 45-51.
- Kumari, M., Rajak, S., Singh, S.P., Kumari, S.I., Kumar, P.U., Murty, U.S., Mahboob, M., Grover, P., Rahman, M.F., 2012. Repeated oral dose toxicity of iron oxide nanoparticles: biochemical and histopathological alterations in different tissues of rats. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12 (3), 2149-2159.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., Kioussi, C., 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol. Biol.* 887, 41-47.
- Landsiedel, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K., Oesch, F., 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations— many questions, some answers. *Mutat. Res.* 681, 241–458.

- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227.
- Lee, H., Park, H.K., Lee, Y.M., Kim, K., Park, S.B., 2007. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chem. Commun.* 28, 2959-2961.
- Lee, D.H., Cho, G., Lim, H.M., Kim, D.S., Kim, C., Lee, S.H., 2013a. Comparisons of particle size measurement method for colloidal silica. *J. Ceram. Process. Res.* 14 (2), 274-278.
- Lee, S.H., Meng, X.W., Flatten, K.S., Loegering, D.A., Kaufmann, S.H., 2013b. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death Differ.* 20 (1), 64-76.
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., Alvarez, P.J., 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res.* 42 (18), 4591-602.
- Li, Y., Chen, D.H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R.A., Zhang, Y., Biris, A.S., Heflich, R.H., Chen, T., 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutat. Res.* 745, 4-10.
- Liang, X.J., Chen, C., Zhao, Y., Jia, L., Wang, P.C., 2008. Biopharmaceutics and therapeutic potential of engineered nanomaterials. *Curr. Drug Metab.* 9 (8), 697-709.
- Lima, R., Seabra, A.B., Durán, N., 2012. Silver nanoparticles: A brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 32 (11), 867-879.
- Linse, S., Cabaleiro-Lago, C., Xue, W.F., Lynch, I., Lindman, S., Thulin, E., Radford, S.E., Dawson, K.A., 2007. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 104, 8691-8696.
- Liu, S., Wei, L., Hao, L., Fang, N., Chang, M.W., Xu, R., Yang, Y., Chen, Y., 2009. Sharper and faster “nano darts” kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano* 3, 3891-3902.
- Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H.C., Wang, T., Liao, C.Y., Cui, L., Zhou, Q.F., Yan, B., Jiang, G.B., 2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology* 4 (3), 319-330.

- Liu, S., Yuzvinsky, T.D., Schmidt, H., 2013. Effect of fabrication-dependent shape and composition of solid-state nanopores on single nanoparticles detection. *ACS Nano* 7, 5621-5627.
- Lobner, D., 2000. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. *J. Neurosci. Methods* 96, 147-152.
- Loeschner, K., Hadrup, N., Qvortrup, K., Larsen, A., Gao, X., Vogel, U., Mortensen, A., Lam, H.R., Larsen, E.H., 2011. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part. Fibre Toxicol.* 8, 18.
- Longmire, H.K.M., Choyke, P.L., 2008. Clearance properties of nanosized particles and molecules as imaging agents: Considerations and caveats. *Nanomedicine* 3, 703- 717.
- Lozano, G.M., Bejarano, I., Espino, J., González, D., Ortiz, A., García, J.F., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A., 2009. Density gradient capacitation is the most suitable method to improve fertilization and to reduce DNA fragmentation positive spermatozoa of infertile men. *Anatol. J. Obstet. Gynecol.* 3(1), 1-7.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cerdevall, T., Dawson, K., 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105, 14265–14270.
- Luoma, S.N., 2008. Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges. The Pew Charitable Trusts and the Woodrow Wilson International Center for Scholars.
- Lux Research, 2014. Nanotechnology Update: Corporations Up Their Spending as Revenues for Nano-enabled Products Increase. Disponible en: [https://portal.luxresearchinc.com/research/report\\_excerpt/16215](https://portal.luxresearchinc.com/research/report_excerpt/16215).
- Luyts, K., Napierska, D., Nemery, B., Hoet, P.H., 2013. How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: complex and unresolved interrelations. *Environ. Sci. Process Impacts* 15 (1), 23-38.
- Lynch, I., Dawson, K.A., Linse, S., 2006. Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Sci STKE* 327, 1–6.
- Lynch, I., Dawson, K., 2008. Protein-nanoparticle interactions. *Nanotoday* 3, 40-47.
- Ma, W., Jing, L., Valladares, A., Mehta, S.L., Wang, Z., Li, P.A., Bang, J.J., 2015. Silver nanoparticle exposure induced mitochondrial stress, caspase-3 activation and cell death: amelioration by sodium selenite. *Int. J. Biol. Sci.* 11 (8), 860-867.
- Ma, D.D., Yang, W.X., 2016. Engineered nanoparticles induce cell apoptosis: potential for cancer therapy. *Oncotarget* 7 (26), 40882-40903.

- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., Dusinska, M., 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 8 (3), 233-78.
- Magnusson, B.A., Jonaitis, T.S., Card, J.W., 2011. A brief review of the occurrence, use, and safety of food-related nanomaterials. *J. Food Sci.* 76, R126-R133.
- Mahmood, M., Casciano, D.A., Mocan, T., Iancu, D.T., Dervishi, E., Li, Z., Abdalmuhsen, M., Biris, A.R., Ali, N., Howard, P., Biris, A.S., 2010. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. *J. Appl. Toxicol.* 30, 74–83.
- Manke, A., Wang, L., Rojanasakul, Y., 2013. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed. Res. Int.* 2013, 1-15.
- Margolin, B.H., Collings, B.J., Mason, J.M., 1983. Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environ. Mutagen.* 5, 705-716.
- Martínez, A., Cambero, I., Ikken, Y., Marín, M.L., Haza, A.I., Morales, P., 1998. Protective effect of broccoli, onion, carrot, and licorice extracts against cytotoxicity of Nnitrosamines evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. *J. Agric. Food Chem.* 46, 585-589.
- Martínez-Abad, A., Sánchez, G., Lagaron, J.M., Ocio, M.J., 2012. Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films for food-packaging applications. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5350-5359.
- Maser, E., Schulz, M., Sauer, U.G., Wiemann, M., Ma-Hock, L., Wohlleben, W., Hartwig, A., Landsiedel, R., 2015. In vitro and in vivo genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO<sub>2</sub> nanomaterials. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 794, 57-74.
- Maurer-Jones, M.A., Lin, Y.S., Haynes, C.L., 2010. Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano* 4, 3363-3373.
- Maurer-Jones, M.A., Gunsolus, I.L., Murphy, C.J., Haynes, C.L., 2013. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal. Chem.* 85 (6), 3036-3049.
- Maynard, A., Michelson, E.S., 2006. The Nanotechnology Consumer Products Inventory. Woodrow Wilson International Center for Scholars.
- McCords, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244 (22), 6049-6065.

- Mei, N., Zhang, Y., Chen, Y., Guo, X., Ding, W., Ali, S.F., Biris, A.S., Rice, P., Moore, M.N., Chen, T., 2012. Silver nanoparticle-induced mutations and oxidative stress in mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 53, 409-419.
- Méndez-Vilas, A., 2011. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Microbiology Book Series vol. 2, 693-1348.
- Merga, G., Wilson, R., Lynn, G., Milosavljevic, B.H., Meisel, D., 2007. Redox catalysis on “Naked” silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 111 (33), 12220–12226.
- Milieu Environmental Law and Policy, 2012. Final Report Environmental Exposure to Nanomaterials – Data Scoping Study. Disponible en: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/exposure\\_nanomaterials.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/pdf/exposure_nanomaterials.pdf).
- Miljoministeriet, Miljostyrelsen, 2013. Draft Order on a register of mixtures and articles that contain nanomaterials as well as the requirement for producers and importers to report to the register (submitted to European Commission - DG Enterprise and Industry). 2013/603/DK
- Ministère de l'Écologie du Développement durable et de l'Énergie, 2012. Arrêté du 6 août 2012 relatif au contenu et aux conditions de présentation de la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire, pris en application des articles R. 523-12 et R. 523-13 du code de l'environnement. *Journal Officiel de la République Française Texte* 18 sur 112.
- Mishra, A., Mehdi, J., Irshad, M., Asgar, A., Eryam, S., Moshahid, M., Rizvi, A., 2012. Effect of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles on Human Cancer Cells. *Sci. Adv. Mater.* 4, 1200–1206.
- Mohammed, A.E., 2015. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles mediated by Eucalyptus camaldulensis leaf extract. *Asian Pacific. J. Trop. Biomed.* 5(5), 382–386.
- Monteiro-Riviere, N.A., Nemanich, R.J., Inman, A.O., Wang, Y.Y., Riviere, J.E., 2005. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 155, 377-384.
- Monteiro-Riviere, N., Inman, A.O., 2006. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon* 44, 1070–1078.
- Morgan, A.B., Chu, L.L., Harris, J.D., 2005. A flammability performance comparison between synthetic and natural clays in polystyrene nanocomposites. *Fire Mater.* 29, 213-229.



- Morley, K., Webb, P., Tokareva, N., Krasnov, A., Popov, V., Zhang, J., Roberts, C., Howdle, S., 2007. Synthesis and characterisation of advanced UHM- WPE/silver nanocomposites for biomedical applications. *Eur. Polymer. J.* 43 (2), 307–314.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Mühlfeld, P.G.C., Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Vanhecke, D., Ochs, M., 2008. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, 817-829.
- Muller, J., Delos, M., Panin, N., Rabolli, V., Huaux, F., Lison, D., 2009. Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat. *Toxicol. Sci.* 110, 442–448.
- Munger, M., Radwanski, P., Hadlock, G.C., Stoddard, G., Shaaban, A., Falconer, J., Grainger, D.W., Deering-Rice, C.D., 2014. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology. Biology and Medicine* 10, 1-9.
- Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol. Sci.* 101, 239–253.
- Nair, S.V., Hettihewa, M., Rupasinghe, H.P., 2014. Apoptotic and inhibitory effects on cell proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by methanol leaf extract of *Costus speciosus*. *Biomed. Res. Int.* 2014, 637098.
- Nakaya, M., Chou, S., Kaneko, M., Nakamura, Y., 1991. Topoisomerase inhibitors have potent differentiation inducing activity for human and mouse myeloid leukaemia cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 184-191.
- Namiki, M., 1992. Antioxidants/antimutagens in food. *Food Sci. Nutr.* 29, 273-300.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311 (5761), 622–627.
- Nel, A., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8, 543-557.
- Nishanth, R.P., Jyotsna, R.G., Schlager, J.J., Hussain, S.M., Reddanna, P., 2011. Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: role of ROS-NFκB signaling pathway. *Nanotoxicology* 5, 502–516.

- Nymark, P., Catalan, J., Suhonen, S., Jarventaus, H., Birkedal, R., Clausen, P.A., Jensen, K.A., Vippola, M., Savolainen, K., Norppa, H., 2013. Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology* 313, 38-48.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., Elder, A.C.P., 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 96, 5-74.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823-839.
- ObservatoryNano., 2009. Nanotechnology in Agrifood sector. Market Report. Prepared by the technology centre ASCR. Disponible en: <http://www.observatorynano.eu/project/document/2545/>.
- Oh, N., Park, J.H., 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* 9 (1), 51-63.
- Olive, P.L., Wlodek, D., Durand, R.E., Banath, J.P., 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell. Res.* 198, 259-267.
- Ong, C., Yung, L.L., Cai, Y., Bay, B., Baeg, G., 2015. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology* 9 (3), 396-403.
- Oropesa, R.O., Jaurégui, U.J., 2012. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *Revista Cenic Ciencias Biológicas* 43, 3.
- Ostiguy, C., Lapointe, G., Ménard, L., Cloutier, Y., Trottier, M., Antoun, M., Normand, C., 2006. Nanoparticles - Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures. Montréal.
- Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1712-1720.
- Pal, S.L., Utpal, J.P.K., Manna, G.P., Mohanta, M.R., 2011. Nano-particle: an overview of preparation and characterization. *J. Appl. Pharma. Sci.* 1(6), 228-234.
- Palmberg, C., Miguët, C., Dernis, H., 2009. Nanotechnology: an overview based on indicators and statistics. *OECD Science, Technology and Industry Working Papers*, 2009/07, 112. doi:10.1787/223147043844.

- Panyman, J., Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.* 55, 329-347.
- Park, J.Y., Li, S.F.Y., Kricka, L.J., 2006. Nanotechnologic Nutraceuticals: Nurturing or Nefarious?. *Clin. Chem.* 52, 331-332.
- Park, E.J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Park, K., 2010. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol. in Vitro* 24, 872–878.
- Park, J., Lim, D.H., Lim, H.J., Kwon, T., Choi, J.S., Jeong, S., Choi, I.H., Cheon, J., 2011a. Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles. *Chem. Commun. (Camb)* 47 (15), 4382-4384.
- Park, M.V., Neigh, A.M., Vermeulen, J.P., de la Fonteyne, L.J., Verharen, H.W., Briedé, J.J., van Loveren, H., de Jong, W.H., 2011b. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32 (36), 9810-9817.
- Parlamento Europeo y Consejo, 2006. Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de sustancias químicas (REACH), se crea la Agencia Europea de Productos Químicos, se modifica la Directiva 1999/45 / CE y se deroga el Reglamento (CEE) nº 793/93 y el Reglamento (CE) n ° 1488/94, así como la Directiva 76/769 / CEE y las Directivas 91/155 / CEE, 93/67 / CEE, 93/105 / CE y 2000/21 / CE. *Diario Oficial de la Unión Europea* L396, 1-849.
- Parlamento Europeo y del Consejo, 2008a. Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aditivos alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* L354, 16-33.
- Parlamento Europeo y del Consejo, 2008b. Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre la clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. *Diario Oficial de la Unión Europea* L353, 1-1355.
- Parlamento Europeo y Consejo, 2009a. Reglamento (CE) nº 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de julio de 2009, sobre la puesta en el mercado y utilización de piensos. *Diario Oficial de la Unión Europea* L229, 1-28.
- Parlamento Europeo y Consejo. 2009b, Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, sobre la comercialización de productos fitosanitarios, se derogan las Directivas del Consejo 79/117/EEC y 91/414/EEC. *Diario Oficial de la Unión Europea* L309, 1-50.

- Parlamento Europeo y del Consejo, 2009c. Reglamento (CE) n° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos. *Diario Oficial de la Unión Europea* L342, 59-209.
- Parlamento Europeo y Consejo, 2011. Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, se modifican los Reglamentos (CE) n° 1924/2006 y (CE) n° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo y se deroga la Directiva 87/250 / CEE, la Directiva 90/496 / CEE, la Directiva 1999/10 / CE, la Directiva 2000/13 / CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002 / 67 / CE y 2008/5 / CE y el Reglamento (CE) n° 608/2004 de la Comisión. *Diario oficial de la Unión Europea* L304, 18-63.
- Parlamento Europeo y del Consejo, 2012. Reglamento (UE) n° 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2012 relativo a la puesta a disposición en el mercado y uso de biocidas. *Diario Oficial de la Unión Europea* L167, 1-123.
- Parlamento Europeo y del Consejo, 2015. Reglamento (UE) n° 2283/2015 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de noviembre de 2015, relativo a los nuevos alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo y se derogan el Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1852/2001 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea* L327, 1-22.
- Pasupuleti, S., Alapati, S., Ganapathy, S., Anumolu, G., Pully, N.R., Prakhya, B.M., 2012. Toxicity of zinc oxide nanoparticles through oral route. *Toxicol. Ind. Health* 28 (8), 675-686.
- Payne, C.M., Bladin, C., Colchester, A.C., Bland, J., Lapworth, R., Lane, D., 1992. Argyria from excessive use of topical silver sulphadiazine. *Lancet* 340, 126.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A., 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3, 473–483.
- Perez, R.G., Hastings, T.G., 2004. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J. Neurochem.* 89 (6), 1318-1324.
- Perlatti, B., de Souza Bergo, P.L., das Graças, M.F., da Silva, F., Batista Fernandes, J., Rossi Forim, M., 2012. Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. *InTech publishers*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/53355>.

- Peters, R., ten Dam, G., Bouwmeester, H., Helsper, J.P.F.G., Allmaier, G., van den Kammer, F., Ramsch, R., Solans, C., Tomaniova, T., Hajslova, J., Weigel, S., 2011. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. *Trac-Trend. Anal. Chem.* 30, 100-112.
- Peters, R., Kramer, E., Oomen, A.G., Herrera Rivera, Z.E., Oegema, G., Tromp, P.C., Fokkink, R., Rietveld, A., Marvin, H.J.P., Weigel, S., Peijnenburg, A.A.C.M., Bouwmeester, H., 2012. Presence of Nano-Sized Silica during In vitro Digestion of Foods Containing Silica as a Food Additive. *ACS Nano* 6, 2441-2451.
- Petersen, E.J., Nelson, B.C., 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 613–650.
- Petković, J., Žegura, B., Stevanović, M., Drnovšek, N., Uskoković, D., Novak, S., Filipić, M., 2011. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO<sub>2</sub> nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology* 5 (3), 341-53.
- Phillips, J.P., Campbell, S.D., Michaud, D., Charbonneau, M., Hilliker, A.J., 1989. Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86, 2761–2765.
- Piao, M.J., Kang, K.A., Lee, I.K., Kim, H.S., Kim, S., Choi, J.Y., Choi, J., Hyun, J.W., 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol. Lett.* 201, 92-100.
- Plantin-Carrenard, E., Braut-Boucher, F., Bernard, M., Derappe, C., Foglietti, M.J., Aubery, M., 2000. Fluorogenic probes applied to the study of induced oxidative stress in the human leukemic HL-60 cell line. *J. Fluoresc.* 10, 167-176.
- Pombo, V., Goyanes, V., 2011. Puntos Cuánticos: Nueva aportación de la nanotecnología en Investigación y Medicina. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 5 (1), 34.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66 (8), 1499-1503.
- Pope, A., Dockery, D., 2006. Health effects of fine particle air pollution: lines that connect. *J. Air & Waste Manage Assoc.* 56, 709-742.
- Porter, D.W., Hubbs, A.F., Mercer, R.R., Wu, N., Wolfarth, M.G., Sriram, K., Leonard, S., Battelli, L., Schwegler-Berry, D., Friend, S., Andrew, M., Chen, B.T., Tsuruoka, S., Endo, M., Castranova, V., 2010. Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology* 269 (2–3), 136–147.

- Posgai, R., Cipolla-McCulloch, C.B., Murphy, K.R., Hussain, S.M., Rowe, J.J., Nielsen, M.G., 2011. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: size, coatings and antioxidants matter. *Chemosphere* 85, 34–42.
- Prabhakar, P.V., Reddy, U.A., Singh, S.P., Balasubramanyam, A., Rahman, M.F., Indu Kumari, S., Agawane, S.B., Murty, U.S., Grover, P., Mahboob, M., 2012. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* 32 (6), 436-45.
- Prota, G., 1992. *Melanins and Melanogenesis*. Academic Press, London.
- Ragnarsson, F.T.E.G., Schoultz, I., Gullberg, E., Carlsson, A.H., Lerm, P.A.M., Magnusson, K.E., Söderholm, J.D., 2008. *Yersinia pseudotuberculosis* induces transcytosis of nanoparticles across human intestinal villus epithelium via invasindependent macropinocytosis. *Lab. Invest.* 88, 1215–1226.
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* 2 (2), 219–236.
- Ranjbar, A., Ataie, Z., Khajavi, F., Ghasemi, H., 2014. Effects of silver nanoparticle (Ag NP) on oxidative stress biomarkers in rat. *Nanomed. J.* 1 (3), 205-211.
- REACH, 2012. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Appendix R7-1 recommendations for nanomaterials applicable to chapter R7a endpoint specific guidance. ECHA-12-G-03-EN.
- Reibold, M., Pau, P., Levin, A.A., Kochmann, W., Patzke, N., Meyer, D.C., 2006. Materials: carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature* 444, 286.
- Reyes-Valerio, C., 1993. De Bonampak al Templo Mayor: el azul maya en Mesoamerica, Colección America nuestra (Mexico DF: Siglo XXI editores) 40: 157.
- Ricaud, M., Witschger, O., 2012. “Les nanomatériaux”. Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS).
- Richards, R.M.E., Odelola, H.A., Anderson, B., 1984. Effect of silver on whole cells and spheroplasts of a silver resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios* 39, 151-158.
- RIKILT, JRC, 2014. Inventory of nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. *EFSA supporting publication 2014:EN-621*, 125 pp. Disponible online: [www.efsa.europa.eu/publications](http://www.efsa.europa.eu/publications).
- Rivera, P., Oberdörster, G., Elder, A., Puentes, V., Wolfgang, J.P., 2010. Correlating Physico-Chemical with Toxicological Properties of Nanoparticles: The Present and the Future. *ACS Nano* 4 (10), 5527–5531.

- Robbens, J., Vanparys, C., Nobels, I., Blust, R., Van Hoecke, K., Janssen, C., De Schamphelaere, K., Roland, K., Blanchard, G., Silvestre, F., Gillardin, V., Kestemont, P., Anthonissen, R., Toussaint, O., Vankoningsloo, S., Saout, C., Alfaro-Moreno, E., Hoet, P., Gonzalez, L., Dubruel, P., Troisfontaines, P., 2010. Eco-, geno- and human toxicology of bio-active nanoparticles for biomedical applications. *Arch. Toxicol.* 269 (2-3) 170-181.
- Robinson, D.K.R., Morrison, M.J., 2010. Nanotechnologies for food packaging: Reporting the science and technology research trends: Report for the Observatory NANO.
- Roco, M., 2011. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J. Nanopart. Res.* 13, 427–445.
- Roszek, B., de Jong, W.H., Geertsma, R.E., 2005. Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices. RIVM Report 265001001/2005. The Netherlands: National Institute for Public Health and Environment.
- Ruíz, O., 2015. Nanomateriales y salud laboral. Estudio del impacto económico de una propuesta de solución reglamentaria. Trabajo final de carrera. Universidad Politécnica de Cataluña. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2099.1/25539>.
- Salma, A.A., Amer, H.A., Shaemaa, H.A., Abdulrahman, K.A., 2011. The effects of gold and silver nanoparticles on transaminase enzymes activities. *Int. J. Chem. Res.* 1, 2249–2329.
- Sambale, F., Wagner, S., Stahl, F., Khaydarov, R.R., Scheper, T., Bahnemann, D., 2015. Investigations of the Toxic Effect of Silver Nanoparticles on Mammalian Cell Lines. *J. Nanomaterials* 2015, 136765.
- Saner, C., Weibel, B., Würzler, F.E., Sengstag, C., 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen* 27, 46-58.
- Sanpui, P., Chattopadhyay, A., Ghosh, S.S., 2011. Induction of Apoptosis in Cancer Cells at Low Silver Nanoparticle Concentrations using Chitosan Nanocarrier. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3(2), 218-228.
- Saqib, Q., Al-Khedhariry, A.A., Siddiqui, M.A., Abou-Tarboush, F.M., Azam, A., Musarrat, J., 2012. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol. In Vitro* 26, 351–361.
- Sayes, C.M., Reed, K.L., Glover, K.P., Swain, K.A., Ostraat, M.L., Donner, E.M., Warheit, D.B., 2010. Changing the dose metric for inhalation toxicity studies: short-term study in rats with engineered aerosolized amorphous silica nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* 22 (4), 348-354.

- SCCP, 2007. Scientific Committee on consumer products. Preliminary opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products. Disponible en:  
[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_099.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_099.pdf)
- SCENIHR, 2007. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Opinion in the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials. Disponible en:  
[http://ec.europa.eu/health/archive/ph\\_risk/committees/04\\_scenihhr/docs/scenihhr\\_o\\_010.pdf](http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_010.pdf).
- SCENIHR, 2009. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Risk Assessment of Products of Nanotechnologies. Disponible en:  
[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihhr/docs/scenihhr\\_o\\_023.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_023.pdf).
- SCENIHR, 2010. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Scientific basis for the definition of the term “nanomaterial”, disponible en:  
[http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/scenihhr\\_o\\_032.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihhr_o_032.pdf)
- Schmid, G., 2005. Nanoparticles: from theory to applications. *Wiley-VCH*, 1, 1-3.
- Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Schlager, J.J., Dai, L., Hussain, S.M., 2008. Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels?. *Nanotechnology* 19 (23), 235104.
- Schreurs, W.J., Rosenberg, H., 1982. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 152, 7-13.
- Sekhon, B.S., 2010. Food nanotechnology an overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 3, 1-15.
- Selby, P.B., Olson, W.H., 1981. Methods and criteria for deciding whether specific locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Rev.* 83, 403-418.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell.* 9 (3), 459-70.
- Shi, Y.H., Xu, Z.R., Feng, J.L., Wang, C.Z., 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology* 129, 138–148.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre. Toxicol.* 10, 15.
- Shukla, S., Jadaunb, A., Arorac, V., Sinhad, R.K., Biyanie, N., Jaina, V.K., 2015. In vitro toxicity assessment of chitosan oligosaccharide coated iron oxide nanoparticles. *Toxicol. Report.* 2, 27–39.



- Shvedova, A.A., Kisin, E., Murray, A.R., Johnson, V.J., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A.F., Mercer, R.R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B.T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, V., Baron, P.A., Kagan, V.E., 2008. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L552–L565.
- Siddiqui, M.A., Saquib, Q., Ahamed, M., Farshori, N.N., Ahmad, J., Wahab, R., Khan, S.T., Alhadlaq, H.A., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A.A., Pant, A.B., 2015. Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 125, 73-81.
- Singh, R., Pantarotto, D., Lacerdam, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., Kostarelos, K., 2006. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbón nanotube radiotracers. *PNAS*. 103 (9), 3357-3362.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Willians, P.M., Maffeis, T.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30 (23-24), 3891-914.
- Singla, P., Mehta, R., Upadhyay, S.N., 2012. Clay Modification by the Use of Organic Cations. *Green and Sustainable Chemistry* 2, 21-25.
- Skebo, J.E., Grabinski, C.M., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2007. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. *Int. J. Toxicol.* 26, 135-141.
- Smith, M.W., Thomas, N.W., Jenkins, P.G., Miller, N.G., Cremaschi, D., Porta, C., 1995. Selective transport of microparticles across Peyer's patch follicle-associated M cells from mice and rats. *Exp. Physiol.* 80, 735-743.
- Smitha, S., Gupta, S., Bartonova, A., Dusinka, M., Gutleb, A., Rahman, Q., 2012. Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environ. Health*. 11, 1-11.
- Snodgrass, R.G., Collier, A.C., Coon, A.E., Pritsos, C.A., 2010. Mitomycin C inhibits ribosomal RNA: a novel cytotoxic mechanism for bioreductive drugs. *J. Biol. Chem.* 285 (25), 19068-75.
- Solhaug, A., Refsnes, M., Lag, M., Schwarze, P.E., Husøy, T., Holme, J.A., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis* 25, 809-819.

- Somasundaran, K., El-deiry, W.S., 2000. Tumor supresor p53: regulation and function. *Front. Biosci.* 5, 424-437.
- Sonavane, G., Tomoda, K., Sano, A., Ohshima, H., Terada, H., Makino, K., 2008. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Coll. Surf. B. Biointerfaces.* 3, 351-358.
- Srivastava, M., Singh, S., Self, W.T., 2012. Exposure to silver nanoparticles inhibits selenoprotein synthesis and the activity of thioredoxin reductase. *Environ. Health Perspect.* 120 (1), 56-61.
- Stambe, C., Atkins, R.C., Tesch, G.H., Masaki, T., Schreiner, G.F., Nikolic-Paterson, D.J., 2004. The role of p38alpha mitogen-activated protein kinase activation in renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2), 370-379.
- StatNano, 2015. StatNano annual Report. Disponible en: <http://statnano.com/publications/3864>.
- Stern, S.T., Adiseshaiah, P.P., Crist, R.M., 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre. Toxicol.* 9, 20.
- Stettler, P.M., Sengstag, C., 2001. Liver carcinogen aflatoxin B1 as an inducer of mitotic recombination in a human cell line. *Mol. Carcinog.* 31, 125-138.
- Suh, J., Jackson, F.R., 2007. Drosophila ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron.* 55 (3), 435-47.
- Sun, X., Wang, Z., Zhai, S., Cheng, Y., Liu, J., Liu, B., 2013. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles in primary rat hepatic stellate cells. *Mol. Med. Rep.* 8 (5), 1365-1372.
- Sung, J.H., Ji, J.H., Park, J.D., Yoon, J.U., Kim, D.S., Jeon, K.S., Song, M.Y., Jeong, J., Han, B.S., Han, J.H., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Cho, M.H., Kelman, B.J., Yu, I.J., 2009. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 108, 452-461.
- Tang, Y., Shen, Y., Huang, L., Lv, G., Lei, C., Fan, X., Lin, F., Zhang, Y., Wu, L., Yang, Y., 2015. In vitro cytotoxicity of gold nanorods in A549 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39 (2), 871-878.
- Tavares, P., Balbinot, F., Martins de Oliveira, H., Fagundes, G.E., Venâncio, M., Vieira Ronconi, J.V., Merlini, A., Streck, E.L., Marques da Silva Paula, M., Moraes de Andrade, V., 2012. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) in vitro and in vivo. *J. Nanopart. Res.* 14, 791
- Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce, B.D., Weiss, J., 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 587-605.

- Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R.C., Lead, J.R., 2012. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7011–7017.
- Terasaka, H., Morshed, S.R., Hashimoto, K., Sakagami, H., Fujisawa, S., 2005. Hydroquinone-induced apoptosis in HL-60 cells. *Anticancer Res.* 25 (1A), 161-170.
- The Royal Society and the Royal Academy of Engineering, 2004. Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. Royal Society and Royal Academy of Engineering, London.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Thurman, R.B., Gerba, C.P., 1989. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 18, 295-315.
- Tinkle, S.S., Antonini, J.M., Rich, B.A., Roberts, J.R., Salmen, R., DePree, K., Adkins, E.J., 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ. Health Perspect.* 111, 1202-1208.
- Tomatis, M., Turci, F., Ceschino, R., Riganti, C., Gazzano, E., Martra, G., Ghigo, D., Fubini, B., 2010. High aspect ratio materials: role of surface chemistry vs. length in the historical "long and short amosite asbestos fibers". *Inhal. Toxicol.* 22 (12), 984-98.
- Tran, Q.H., Nguyenm, V.Q., Le, A.T., 2013. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 4 (3), 1-20.
- Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W., Goessler, W., 2006. Silver coated ressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J. Trauma.* 60, 648-652.
- Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., Schiestl, R.H., 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 69 (22), 8784-8789.
- Uboldi, C., Urbán, P., Gilliland, D., Bajak, E., Valsami-Jones, E., Ponti, J., Rossi, F., 2016. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* 31, 137-45.
- Uddin, F., 2008. Clays, Nanoclays, and Montmorillonite Minerals. *Metallurgical and Materials Transactions A.* 39 (12), 2804-2814.
- Ueda, S., Nakamura, H., Masutani, H., Sasada, T., Yonehara, S., Takabayashi, A., Yamaoka, I., Yodoi, J., 1998. Redox regulation of caspase-3-(like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J. Immunol.* 161, 6689-6695.

- UK-FSA, 2013. Nanotechnology-enabled foods and food contact materials on the UK market. Disponible en: <http://www.food.gov.uk/policy-advice/nano/monitoring/>.
- Ulukaya, E., Acilan, C., Ari, F., İkitimur, E., Yilmaz, Y., 2011. A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turk. J. Biochem.* 36 (3), 261–269.
- Umweltbundesamt, 2014. Concept for a European Register of Products Containing Nanomaterials. Berlin. Disponible en: [http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/information\\_concept\\_nanoregister\\_npr\\_e\\_0.pdf](http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/information_concept_nanoregister_npr_e_0.pdf).
- UNE-ISO/TR 12885:2010 IN, 2010. Nanotecnologías. Prácticas de seguridad y salud en lugares de trabajo relacionados con las nanotecnologías.
- Uriarte, M., Bald, C., 2008. Nanotecnología en la industria alimentaria. *Alimentación, equipos y tecnología* 27 (235), 50-54.
- Van der Zande, M., Vandebriel, R., Van Doren, E., Kramer, E., Rivera, Z., Serrano-Rojero, C., Gremmer, E., Mast, J., Peters, R., Hollman, P., Hendriksen, P., Marvin, H., Peijnenburg, A.A., Bouwmeester, H., 2012. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 6, 7427-7442.
- Van der Zande, M., Vandebriel, R.J., Groot, M.J., Kramer, E., Herrera Rivera, Z.E., Rasmussen, K., Ossenkoppele, J.S., Tromp, P., Gremmer, E.R., Peters, R.J., Hendriksen, P.J., Marvin, H.J., Hoogenboom, R.L., Peijnenburg, A.A., Bouwmeester, H., 2014. Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 8.
- Van Haaften, R., Haenen, G., Evelo, C., Bast, A., 2003. Effect of vitamina E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab. Rev.* 35, 215-253.
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769-1780.
- Vega-Villa, K.R., Takemoto, J.K., Yáñez, J.A., Remsberg, C.M., Forrest, M.L., Davies, N.M., 2008. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 929–938.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cell using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 339-351.
- Verweij, J., Pinedo, H.M., 1990. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drug* 1 (1), 5-13.

- Vevers, W.F., Jha, A.N., 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology* 17, 410–420.
- Vicario, I.M., 1997. Peroxidación lipídica, antioxidantes de la dieta y enfermedad cardiovascular. *Nutr. Clin.* 16, 19-28.
- Vlastos, D., Mademtoglou, D., Drosopoulou, E., Efthimiou, I., Chartomatsidou, T., Pandelidou, C., Astyrakaki, M., Chalatsi, E., Mavragani-Tsipidou, P., 2013. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of Chios mastic water by the in vitro micronucleus test on human lymphocytes and the in vivo wing somatic test on *Drosophila*. *PLoS One* 8 (7), e69494.
- Wadhera, A., Fung, M., 2005. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatol. Online J.* 11, 12. Disponible en [http:// dermatology.cdlib.org](http://dermatology.cdlib.org).
- Wagner, A.J., Bleckmann, C.A., Murdock, R.C., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2007. Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages. *J. Phys. Chem. B.* 111 (25), 7353-7359.
- Walter, M.F., Black, B.C., Afshar, G., Kermabon, A.Y., Wright, T.R., Biessmann, H., 1991. Temporal and spatial expression of the yellow gene in correlation with cuticle formation and dopa decarboxylase activity in *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 147 (1), 32-45.
- Wang, Q., Ponomareva, O.N., Lasarev, M., Turker, M.S., 2006. High frequency induction of mitotic recombination by ionizing radiation in Mlh1 null mouse cells. *Mutat. Res.* 594, 189-198.
- Wang, H., Keum, J.K., Hiltner, A., Baer, E., Freeman, B., Rozanski, A., Galeski, A., 2009a. Confined crystallization of polyethylene oxide in nanolayer assemblies. *Science*, 323, 757-760.
- Wang, Z., Tiruppathi, C., Minshall, R.D., Malik, A.B., 2009b. Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. *ACS Nano* 3, 4110–4116.
- Wang, L., Liu, Y., Li, W., Jiang, X., Ji, Y., Wu, X., Xu, L., Qiu, Y., Zhao, K., Wei, T., Li, Y., Zhao, Y., Chen, C., 2011. Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy. *Nano Lett.* 11, 772–780.
- Wang, Q., Ma, X., Zhang, W., Pei, H., Chen, Y., 2012. The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. *Metallomics* 4, 1105-1112.
- Warheit, D.B., Webb, T.R., Colvin, V.L., Reed, K.L., Sayes, C.M., 2007. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine quartz particles in rats: Toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol. Sci.* 95, 270-280.

- Warheit, D.B., Sayes, C.M., Reed, K.L., Swain, K.A., 2008. Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol. Ther.* 120 (1), 35-42.
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., van Goetz, N., 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2242-2250.
- Weyermann, J., Lochman, D., Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369-376.
- Wijnhoven, S.W., Sonneveld, E., Kool, H.J., van Teijlingen, C.M., Vrieling, H., 2003. Chemical carcinogens induce varying patterns of LOH in mouse T-lymphocytes. *Carcinogenesis* 24, 139-144.
- Willingham, M.C., 1999. Cytochemical Methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1101-1109.
- Wittkopp, P.J., Beldade, P., 2009. Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 20, 65–71.
- Wlodkowic, D., Skommer, J., Darzynkiewicz, Z., 2009. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol. Biol.* 559, 19-32.
- Woolf, T.B., Roux, B., 1996. Structure, energetics, and dynamics of lipid-protein interactions: a molecular dynamics study of the gramicidin A channel in a DMPC bilayer. *Proteins* 24, 92–114.
- Würgler, F.E., Vogel, E.W., 1986. Chemical, Principles and Methods for Their Detection. In: de Serres, F.J. (Ed.), Plenum, New York.
- [www.centerforfoodsafety.org/issues/682/nanotechnology/food-and-nanotechnology](http://www.centerforfoodsafety.org/issues/682/nanotechnology/food-and-nanotechnology).
- Nanotechnology in food. Interactive tool.
- Xu, J., Yang, F., An, X., Hu, Q., 2007. Anticarcinogenic Activity of Selenium-Enriched Green Tea Extracts in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5349–5353.
- Yoksan, R., Chirachanchai, S., 2008. Amphiphilic chitosan nanosphere: studies on formation, toxicity, and guest molecule incorporation. *Bioorg. Med. Chem.* 16 (5), 2687-2696.
- Yoosaf, K., Ipe, B., Suresh, C.H., Thomas, K.G., 2007. In situ synthesis of metal nanoparticles and selective naked-eye detection of lead ions from aqueous media. *J. Phys. Chem. C* 111, 12839-12847.
- Young, K.D., 2006. The selective value of bacterial shape. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 660–703.

- Yu, K.N., Yoon, T.J., Minai-Tehrani, A., 2013. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1187–1195.
- Yue, Y., Behra, R., Sigg, L., Fernández-Freire, P., Pillai, S., Schirmer, K., 2015. Toxicity of silver nanoparticles to a fish gill cell line: Role of medium composition. *Nanotoxicology* 9, 54–63.
- Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 6–20.
- Zamai, L., Canonico, B., Luchetti, F., Ferri, P., Melloni, E., Guidotti, L., Cappellini, A., Cutroneo, G., Vitale, M., Papa, S., 2001. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherente cells. *Cytometry* 44, 57-64.
- Zhang, Y., Sun, J., 2007. A study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials. *Chin. J. Med. Instrumen.* 31, 35-38.
- Zhang, X.D., Wu, H.I., Wu, D., Wang, Y.Y., Chang, J.H., Zhai, Z.B., Meng, A.M., Liu, P.X., Zang, L.A., Fan, F.Y., 2010. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int. J. Nanomedicine* 5, 771-781.
- Zhang, L., Wang, L., Hu, Y., Liu, Z., Tian, Y., Wu, X., Zhao, Y., Tang, H., Chen, C., Wang, Y., 2013. Selective metabolic effects of gold nanorods on normal and cancer cells and their application in anticancer drug screening. *Biomaterials* 34, 7117–7126.
- Zhu, H., Bannenberg, G., Moldeus, P., Shertzer, H., 1994. Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'- dichlorofluorescein. *Arch. Toxicol.* 68, 582-587.

# APÉNDICE







## APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| €                              | Euros  |
| A431                           | Células de carcinoma de piel humano                                      |
| A549                           | Células de epitelio alveolar humano                                      |
| ADME                           | Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción                         |
| ADN                            | Ácido Desoxirribonucleico  |
| AESAN                          | Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición                    |
| Ag                             | Plata  |
| AgNPs                          | Nanopartículas de plata  |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Óxido de aluminio  |
| ARN                            | Ácido Ribonucleico   |
| ATP                            | Adenosín Trifosfato (del inglés, <i>Adenosine Triphosphate</i> )         |
| AuNPs                          | Nanopartículas de oro  |
| C <sub>60</sub>                | Fullerenos   |
| BaO                            | Óxido de bario   |
| BaP                            | Benzopireno  |
| Bax                            | Miembro proapoptótico de la subfamilia Bax, pertenece a la familia Bcl-2 |
| Bcl-2                          | Familia de proteínas del gen 2 de células B                              |
| BEAS-2B                        | Células epiteliales bronquiales humanas                                  |
| C3A                            | Células hepáticas humanas  |
| Caco-2                         | Células de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano                   |
| CAT                            | Catalasa   |
| CE                             | Comisión Europea   |
| CIB                            | Centro de Investigaciones Biológicas                                     |
| CNTs                           | Nanotubos de carbono   |
| CO <sub>2</sub>                | Dióxido de carbono   |
| CuNPs                          | Nanopartículas de cobre  |
| d.C.                           | después de Cristo  |
| DCF                            | dihidrofluoresceína  |
| <i>D. melanogaster</i>         | <i>Drosophila melanogaster</i>   |
| DL <sub>50</sub>               | Dosis Letal 50   |
| DLS                            | Dispersión de Luz Dinámica   |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| DO                             | Densidad óptica   |
| e <sup>-</sup>                 | Electrón  |
| E551                           | Óxido de silicio  |
| E171                           | Óxido de titanio  |
| E172                           | Óxido de hierro   |
| EDX                            | Análisis por Dispersión de Energías de Rayos X (del inglés, <i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> )                         |
| EEUU                           | Estados Unidos  |
| EFSA                           | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés, <i>European Food Safety Authority</i> )                                   |
| Endo-III                       | Enzima endonucleasa III   |
| EROs                           | Especies Reactivas del Oxígeno  |
| EPO                            | Oficina Europea de Patentes (del inglés, <i>European Patent Office</i> )  |
| EU-OSHA                        | Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo (del inglés, <i>European Agency for Safety and Health at Work</i> )    |
| FAAS                           | Espectrómetro de Absorción Atómica de Llama (del inglés, <i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i> )                            |
| FAM                            | Grupo de carboxifluoresceína  |
| FAO                            | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés, <i>Food and Agriculture Organization</i> ) |
| FDA                            | Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (del inglés <i>Food and Drug Administration</i> )                |
| FE1                            | Células epiteliales pulmonares de ratón   |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Óxido de hierro (III)   |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | Óxido de hierro (II, III)   |
| FECYT                          | Fundación Española para la Ciencia y Tecnología   |
| FFF                            | Fraccionamiento de Flujo  |
| FLICA                          | Inhibidor fluorescente específico de las caspasas -3 y -7   |
| FMK                            | Fluorometilcetona   |
| Fpg                            | Enzima Formamidopirimidina-DNA glicosilasa  |
| FS                             | Fosfatidilserina  |
| FSAI                           | Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda (del inglés, <i>Food Safety Authority of Ireland</i> )                              |
| GCS                            | γ Glutamilcisteína sintetasa  |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| GI                            | Gastrointestinal   |
| GPx                           | Glutación peroxidasa   |
| GR                            | Glutación reductasa  |
| GSH                           | Glutación reducido   |
| GSSG                          | Glutación oxidado  |
| GSSG/ GSH                     | Contenido total de glutación   |
| GST                           | Glutación-S-transferasa  |
| H <sub>2</sub> DCF            | Diclorodihidrofluoresceína   |
| H <sub>2</sub> DCFDA          | Diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno  |
| HaCaT                         | Queratinocitos humanos de piel   |
| HaP                           | Hidrocarburo Aromático Policíclico   |
| HB                            | Cruce alta bioactivación   |
| HDC                           | Cromatografía Hidrodinámica  |
| HEK293                        | Células embrionarias de riñón humano   |
| HeLa                          | Células tumorales cérvico-uterinas humanas   |
| HepG2                         | Células de hepatoma humano   |
| HL-60                         | Células de leucemia humana   |
| HPF                           | Fibroblastos de pulmón humano ( <i>del inglés, Human Pulmonary Fibroblasts</i> )   |
| Hsp70                         | Proteína de choque térmico 70  |
| HT-1080                       | Células de fibrosarcoma humano   |
| I+D                           | Investigación y Desarrollo   |
| IC <sub>50</sub>              | Concentración inhibitoria del 50%  |
| ICON                          | Consejo Internacional de Nanotecnología  |
| ICP                           | Plasma Acoplado Inductivamente ( <i>del inglés, Inductively Coupled Plasma</i> )   |
| ICP-MS                        | Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente ( <i>del inglés, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> ) |
| INIA                          | Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria   |
| INSHT                         | Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo  |
| IP                            | Ioduro de propidio   |
| IPC                           | Clasificación Internacional de Patentes ( <i>del inglés, International Patent Classification</i> )                             |

|                   |   |
|-------------------|---|
| IR                | Espectroscopia Infrarroja   |
| ISO               | Organización Internacional de Normalización (del inglés, <i>International Standard Organization</i> ) |
| JRC               | Centro Común de Investigación (del inglés, <i>Joint Research Centre</i> )                             |
| LDH               | Lactato Deshidrogenasa  |
| MALS              | Dispersión de Luz Multiangular  |
| MC3T3             | Osteoblastos de ratón   |
| MCF-7             | Células de adenocarcinoma de pecho  |
| MET               | Microscopía Electrónica de Transmisión  |
| MFA               | Microscopía de Fuerza Atómica   |
| MMC               | Mitomicina C  |
| Mo                | Molibdeno   |
| MP                | Micropartícula  |
| MTT               | Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio   |
| NaBH <sub>4</sub> | Borohidruro de sodio  |
| NAC               | N-acetilcisteína  |
| Nd                | No definido   |
| NHDF              | Fibroblastos de piel humana (del inglés, <i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i> )                     |
| NIH3T3            | Fibroblastos de rata  |
| nm                | Nanometro   |
| NMs               | Nanomateriales  |
| NO                | Óxido nítrico   |
| NPs               | Nanopartículas  |
| NTA               | Análisis de seguimiento de nanopartículas (del inglés, <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> )        |
| OCDE              | Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos   |
| OIT               | Organización Internacional del Trabajo  |
| ONG               | Organización no Gubernamental   |
| p53               | Gen supresor de tumores   |
| PC-12             | Feocromocitona adrenal de rata  |
| PEI               | Polieterimida   |
| PPTM              | Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial   |
| PVP               | Polivinilpirrolidona  |

|                  |   |
|------------------|---|
| PYME             | Pequeña y Mediana Empresa   |
| RAW264,7         | Macrófagos de ratón   |
| SAS              | Sílice Amorfa Sintética   |
| SCENIHR          | Comité Científico de Riesgos para la Salud Emergentes y Nuevamente Identificados (del inglés, <i>Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks</i> ) |
| SCPP             | Sociedad Civil de Productores de Fonogramas (del francés, <i>Société civile des Producteurs Phonographiques</i> )   |
| SDH              | Succinato deshidrogenasa mitocondrial   |
| SGC-7901         | Células de carcinoma gástrico   |
| SI               | Sistema Internacional   |
| Si               | Silicio   |
| SiO <sub>2</sub> | Dióxido de silicio  |
| SMART            | Test de Mutación y Recombinación Somática   |
| SOD              | Superóxido dismutasa  |
| SST              | Seguridad y Salud en el Trabajo   |
| ST               | Cruce estándar  |
| SWCNT            | Nanotubos de carbono de una sola pared (del inglés, <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i> )   |
| TdT              | Enzima deoxinucleotidil transferasa   |
| TiO <sub>2</sub> | Óxido de titanio  |
| TNFR             | Familia del receptor del factor de necrosis tumoral   |
| TUNEL            | Método de marcaje de los extremos 3'-OH libres del DNA, utilizando la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT) y nucleótidos modificados                                 |
| U937             | Monocitos humanos   |
| UBA              | Agencia Federal Alemana para el Medio Ambiente  |
| UE               | Unión Europea   |
| UV               | Ultravioleta  |
| VIH-1            | Virus de la Inmunodeficiencia Humana  |
| XOD              | Xantina oxidasa   |
| XPS              | Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (del inglés, <i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i> )  |
| ZnO              | Óxido de Zinc   |

## APÉNDICE 2. LISTADO DE TABLAS

### CAPÍTULO II

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| <b>Tabla 1</b> | Definiciones de nanotecnología.....  | 26 |
| <b>Tabla 2</b> | Aplicaciones de la nanotecnología por sector de actividad.....   | 37 |
| <b>Tabla 3</b> | Potenciales aplicaciones del uso de NMs en la industria agroalimentaria.....                                       | 41 |
| <b>Tabla 4</b> | Ejemplos de productos comercializados con NMs en la industria agroalimentaria (www.centerforfoodsafety.org).....   | 45 |
| <b>Tabla 5</b> | Técnicas para la detección y caracterización de NMs en alimentos, piensos y otras muestras biológicas.....         | 52 |
| <b>Tabla 6</b> | Principales parámetros cualitativos y cuantitativos para determinar la exposición de los NMs.....                  | 58 |
| <b>Tabla 7</b> | Estudios de toxicidad <i>in vivo</i> de NMs.....   | 59 |
| <b>Tabla 8</b> | Estudios de toxicidad <i>in vitro</i> de NMs.....  | 61 |
| <b>Tabla 9</b> | Marco jurídico de la UE que regula los procedimientos de autorización de NMs en aplicaciones agroalimentarias..... | 72 |

### CAPÍTULO III

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tabla 10</b> | Características de las AgNPs utilizadas en este estudio obtenidas por NanoGap y Sigma-Aldrich..... | 79 |
|-----------------|--|----|

### CAPÍTULO IV

#### Artículo II

|                |  |     |
|----------------|--|-----|
| <b>Table 1</b> | <i>Characteristics of silver nanoparticles (AgNPs) obtained from NanoGap.....</i>  | 116 |
| <b>Table 2</b> | <i>Summary of silver nanoparticles (AgNPs) size characteristics by transmission electron microscopy (TEM) and DLS.....</i> | 119 |
| <b>Table 3</b> | <i>Calculated EC<sub>50</sub> values in HepG2 and HL-60 cell lines.....</i>  | 121 |

#### Artículo III

|                |   |     |
|----------------|---|-----|
| <b>Table 1</b> | <i>Characteristics of silver nanoparticles (AgNPs) obtained from NanoGap.....</i> | 130 |
|----------------|---|-----|

#### Artículo IV

|                |  |     |
|----------------|--|-----|
| <b>Table 1</b> | <i>Calculated EC<sub>50</sub> values of Ag-AuNPs in HPF cells.....</i> | 143 |
|----------------|--|-----|

#### Artículo V

|                |   |     |
|----------------|---|-----|
| <b>Table 1</b> | <i>Characteristics of AgNPs obtained from NanoGap. Nd- no information provided.....</i> | 154 |
|----------------|---|-----|

## Artículo VI

|                |  |     |
|----------------|--|-----|
| <b>Table 1</b> | <i>Characteristics of AgNPs obtained from NanoGap. Nd- no information provided.....</i>  | 166 |
| <b>Table 2</b> | <i>Summary of the results obtained in the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on Drosophila melanogaster with the standard cross (ST), after larvae treatment with different concentrations of AgNPs of 4.7 and 42 nm.....</i>           | 167 |
| <b>Table 3</b> | <i>Summary of the results obtained in the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on Drosophila melanogaster with the high bioactivation cross (HB), after larvae treatment with different concentrations of AgNPs of 4.7 and 42 nm.....</i> | 168 |

## APÉNDICE 3. LISTADO DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Número de patentes de nanotecnología en la EPO (European Patent Office) en 2015 (StatNano, 2015)..... | 21 |
| <b>Figura 2</b>  | Número de productos nanotecnológicos por zonas geográficas (Palmberg y col., 2009).....               | 21 |
| <b>Figura 3</b>  | Vidriera gótica con NPs de oro (A), espada de Damasco (B) y pintura con azul maya (C).....            | 24 |
| <b>Figura 4</b>  | Vaso de Lycurgus. Vista con luz reflejada (A) y luz transmitida (B).....                              | 24 |
| <b>Figura 5</b>  | Historia cronológica de la Nanotecnología.....  | 25 |
| <b>Figura 6</b>  | Escala comparativa de objetos macro, micro y nano.....  | 26 |
| <b>Figura 7</b>  | Fuentes comunes de NPs en el medio ambiente (Smita y col., 2012).....                                 | 28 |
| <b>Figura 8</b>  | Principales métodos para la fabricación de NPs.....   | 28 |
| <b>Figura 9</b>  | Posible mecanismo de actividad antibacteriana por las AgNPs.....                                      | 32 |
| <b>Figura 10</b> | Aplicaciones de las AgNPs (Keat y col., 2015).....  | 33 |
| <b>Figura 11</b> | Fullereno.....  | 34 |
| <b>Figura 12</b> | Nanotubo de carbono.....  | 35 |



|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 13</b> | Número de productos con NMs disponibles en el tiempo en las diferentes categorías de productos de consumo (Vance y col., 2015).....   | 38 |
| <b>Figura 14</b> | (a) Composición de los NMs que figuran en el inventario agrupados en cinco categorías principales: no se anuncian, metal, NMs carbonosos, NMs basados en silicio y otros. (b) Composición elemental de los NMs que figuran en el categoría metales: plata, titanio, zinc, oro y otros metales. (c) NMs carbonosos (Vance y col., 2015)..... | 38 |
| <b>Figura 15</b> | Cadena de producción de alimentos (RIKILT y JRC, 2014).....   | 39 |
| <b>Figura 16</b> | Principales tipos de NMs usados para la alimentación y las aplicaciones relacionadas.....   | 40 |
| <b>Figura 17</b> | Evolución de la cantidad de artículos científicos arbitrados sobre riesgos a la salud y/o el medio ambiente de los NMs manufacturados 2000-2010.....  | 46 |
| <b>Figura 18</b> | Fases de la evaluación del riesgo.....  | 47 |
| <b>Figura 19</b> | Principales factores físico-químicos que afectan a la toxicidad intrínseca de las AgNPs.....  | 49 |
| <b>Figura 20</b> | Principales vías de exposición de las NPs.....  | 53 |
| <b>Figura 21</b> | Deposición teórica total en el pulmón en función del diámetro de partículas. (UNE-ISO/TR 12885:2010 IN).....  | 54 |
| <b>Figura 22</b> | Mecanismos de toxicidad inducidos por NPs. Adaptado de Horie y col., 2012.....  | 63 |
| <b>Figura 23</b> | Biocinética y lugares de acumulación de las NPs (Shi y col., 2013).....   | 66 |
| <b>Figura 24</b> | Esquema ilustrativo de los posibles mecanismos de internalización de las NPs.....   | 67 |

### CAPÍTULO III

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 25</b> | Morfología de las líneas HepG2 (A), HL-60 (B), NHDF (C) y HPF (D) al microscopio óptico.....   | 77 |
| <b>Figura 26</b> | Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> .....  | 78 |
| <b>Figura 27</b> | Determinación de la morfología y el tamaño por el MET.....   | 82 |
| <b>Figura 28</b> | Esquema del fundamento del DLS.....  | 82 |
| <b>Figura 29</b> | Determinación del tamaño hidrodinámico de NPs con DLS.....   | 83 |
| <b>Figura 30</b> | Reacción de metabolización del MTT a formazán, mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en células viables..... | 84 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 31</b> | Procedimiento del método colorimétrico MTT.....   | 85 |
| <b>Figura 32</b> | Reacción de metabolización de lactato a piruvato y de tetrazolio a formazan, mediante la actividad de la enzima LDH en las células viables.....   | 85 |
| <b>Figura 33</b> | Procedimiento del método de liberación de LDH.....  | 86 |
| <b>Figura 34</b> | Ensayo Cometa.....  | 87 |
| <b>Figura 35</b> | Tricomas de la parte dorsal de las alas de <i>D. Melanogaster</i> . A. Sectores simples pequeños <i>mwh</i> ; B. Sector simple grande <i>mwh</i> ; C. Sectores simples <i>flr3</i> ; D. Sector doble..... | 89 |
| <b>Figura 36</b> | Ensayo SMART en alas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....  | 90 |
| <b>Figura 37</b> | Hidrólisis del H <sub>2</sub> DCFDA por esterasas intracelulares a H <sub>2</sub> DCF, y su posterior oxidación a DCF en presencia de las EROs.....   | 90 |
| <b>Figura 38</b> | Método del diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (H <sub>2</sub> DCFDA).....   | 91 |
| <b>Figura 39</b> | Principio fundamental del ensayo OxiSelect total glutatión. Reducción de la GSSG a GSH por acción de la glutatión reductasa.....  | 91 |
| <b>Figura 40</b> | Procedimiento del método OxiSelect total glutatión (GSSG / GSH).....  | 92 |
| <b>Figura 41</b> | Los aniones superóxido (O <sup>2-</sup> ) son generados por el sistema XOD. En presencia de SOD, estas concentraciones de aniones superóxido se reducen, dando señal menos colorimétrica.....             | 93 |
| <b>Figura 42</b> | Procedimiento del método OxiSelect Actividad de la superóxido dismutasa (SOD).....  | 93 |
| <b>Figura 43</b> | Características morfológicas de apoptosis: (A) burbujeo de la membrana o “blebbing”; (B) condensación de la cromatina; y (C) formación de cuerpos apoptóticos.....  | 94 |
| <b>Figura 44</b> | Detección morfológica de apoptosis.....   | 95 |
| <b>Figura 45</b> | Detección de la fosfatidilserina (FS) por el ensayo Anexina V/IP.....   | 95 |
| <b>Figura 46</b> | Ensayo Anexina V/IP.....  | 96 |
| <b>Figura 47</b> | Incorporación de los nucleótidos dUTPfluoresceína a los extremos 3'-OH libres del DNA por la acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT).....  | 97 |
| <b>Figura 48</b> | Ensayo TUNEL.....   | 97 |
| <b>Figura 49</b> | Mecanismo de acción del reactivo de FLICA.....  | 98 |
| <b>Figura 50</b> | Detección de caspasas activas.....  | 98 |

## CAPÍTULO IV

### Artículo I

- Figure 1** Representative TEM images of AgNPs. The AgNPs were dispersed in aqueous solution (panel A). Panel B is an image of AgNPs after 24 h incubation in cell-free culture media. Scale bars represent 100 nm in panel A and 200 nm in panel B..... 107
- Figure 2** Effects of AgNPs 157 nm on HepG2 cell viability by MTT and LDH assays. Cells were cultured with different concentrations of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*  $p \leq 0.05$ ..... 108
- Figure 3** Effects of AgNPs 157 nm on HL60 cell viability by MTT and LDH assays. Cells were cultured with different concentrations of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*  $p \leq 0.05$ ..... 108
- Figure 4** Effects of AgNPs 157 nm on NHDF cell viability by MTT and LDH assays. Cells were cultured with different concentrations of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*  $p \leq 0.05$ ..... 109
- Figure 5** Effects of AgNPs 157 nm on HPF cell viability by MTT and LDH assays. Cells were cultured with different concentrations of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*  $p \leq 0.05$ ..... 109
- Figure 6** Protective effects of NAC against treatment with 13.45 µg/mL of AgNPs on HepG2 (A) and HL-60 (B) cell viability by MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 h..... 109
- Figure 7** Protective effects of NAC against treatment with 13.45 µg/mL of AgNPs on NHDF (A) and HPF (B) cell viability by MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 h..... 110

## Artículo II

- Figure 1** Representative transmission electron microscopy (TEM) images of silver nanoparticles (AgNPs). AgNP 4.7nm (A) was well dispersed in aqueous solution. (B) Image of AgNP after 24-h incubation in cell-free culture media. Scale bars represent 100 nm. Distribution of size of AgNPs in aqueous solution by TEM (C). DLS size distributions (D) for 24h incubations of AgNPs in HepG2 media (–) and HL-60 media (– · – · –). ..... 118
- Figure 2** Representative transmission electron microscopy (TEM) images of silver nanoparticles (AgNPs). AgNP 42nm (A) was well dispersed in aqueous solution. (B) Image of AgNP after 24-h incubation in cell-free culture media. Scale bars represent 100nm in A and B. Distribution of the size of AgNPs in aqueous solution by TEM (C). DLS size distributions (D) for 24h incubations of AgNPs in HepG2 media (–) and HL-60 media (– · – · –). ..... 119
- Figure 3** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 (A) and 42nm (B) on HepG2 cell viability by the MTT and LDH assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate a significant difference from the control \*\*\*P≤0.001, \*\*P≤0.01 and \*P≤0.05..... 120
- Figure 4** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) 4.7 (A) and 42nm (B) on HL60 cell viability by the MTT and LDH assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate a significant difference from the control \*\*\*P ≤ 0.001 and \*P ≤ 0.05..... 120
- Figure 5** Protective effects of N-Acetyl-L-cysteine (NAC) against treatment with 24-h MTT EC<sub>50</sub> doses of AgNPs of 4.7 (■) and 42nm (□) in HepG2 and HL-60 cell viability using MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 h. Asterisks indicate a significant difference from the control \*\*\*P ≤ 0.001 and \*P ≤ 0.05..... 121
- Figure 6** Time course of reactive oxygen species (ROS) production in untreated HepG2 (A) cells (Δ) and treated with silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 (◆) or AgNPs of 42nm (▣). (B) Untreated HL-60 cells (Δ) and treated with AgNPs of 4.7nm (◆) and 42nm (▣). Asterisks indicate a significant difference from the control \*\*P ≤ 0.01 and \*P ≤ 0.05 .....122

- Figure 7** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 and 42nm in the total glutathione content on HepG2 (A) and HL-60 (B) cells. Cells were cultured with 24-h MTT  $EC_{50}$  doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) h. Control untreated cells. Asterisks indicate a significant difference from the control  $**P \leq 0.01$  and  $*P \leq 0.05$ .....122
- Figure 8** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) 4.7 and 42nm in the superoxide dismutase (SOD) activity on HepG2 (A) and HL-60 (B) cells. Cells were cultured with 24-h MTT  $EC_{50}$  doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) h.....122
- Artículo III**
- Figure 1** Dynamic light scattering (DLS) size distributions for 24 hours incubations of silver nanoparticles (AgNPs) 4.7 nm (panel A) and AgNPs 42nm (panel B) in normal human dermal fibroblasts (NHDF) media.....132
- Figure 2** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) 4.7 nm on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cell viability by MTT and lactate dehydrogenase (LDH) assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) hours.  $C_0$  – untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control  $***P \leq 0.001$  and  $*P \leq 0.05$  .....133
- Figure 3** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) 42 nm on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cell viability by MTT and lactate dehydrogenase (LDH) assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (▣) hours.  $C_0$  – untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control  $***P \leq 0.001$  and  $**P \leq 0.01$  .....134
- Figure 4** Protective effects of N-acetyl-L-cysteine (NAC) against treatment with 24 hours MTT  $EC_{50}$  doses of silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 (■) and 42nm (□) in normal human dermal fibroblasts (NHDF) cell viability by MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24 hours. Asterisks indicate significant difference from control  $***P \leq 0.001$ ,  $**P \leq 0.01$  and  $*P \leq 0.05$ .....134
- Figure 5** Time-course of reactive oxygen species (ROS) production in untreated normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells (□) and treated with silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7nm (◆) or AgNPs of 42nm (Δ). Asterisks indicate significant difference from control  $**P \leq 0.01$  and  $*P \leq 0.05$ .....134

**Figure 6** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 and 42nm in the total glutathione content on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells. Cells were cultured with 24 hours MTT EC<sub>50</sub> doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (■) hours. Control – untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control  $^{**}P \leq 0.01$  and  $^{*}P \leq 0.05$ .....135

**Figure 7** Effects of silver nanoparticles (AgNPs) of 4.7 and 42nm in the superoxide dismutase (SOD) activity on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells. Cells were cultured with 24 hours MTT EC<sub>50</sub> doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (■) hours.....135

#### Artículo IV

**Figure 1** Effects of AgNPs 4.7 nm and 42 nm on HPF cell viability by MTT (A, C) and LDH (B, D) assays. Cells were cultured with different doses of AgNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (■) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control  $^{***}p \leq 0.001$ ,  $^{**}p \leq 0.01$  and  $^{*}p \leq 0.05$ ..145

**Figure 2** Effects of AuNPs 30 nm, 50 nm and 90 nm on HPF cell viability by MTT (A, B, C) and LDH (D, E, F) assays. Cells were cultured with different doses of AuNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (■) h. C<sub>0</sub> untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control  $^{***}p \leq 0.001$  and  $^{**}p \leq 0.01$  .....145

**Figure 3** Protective effects of NAC against treatment with 24 h MTT EC<sub>50</sub> doses of AgNPs of 4.7 and 42 nm (A) and AuNPs of 30, 50 and 90 nm (B) in HPF cell viability by MTT assay. Cells were cultured with different doses of NAC for 24h. Asterisks indicate significant difference from control  $^{***}p \leq 0.001$  .146

**Figure 4** Time-course of ROS production in untreated HPF cells (○) and treated with 24 h MTT EC<sub>50</sub> doses of AgNPs (A) of 4.7 nm (●) and 42 nm (■) and AuNPs (B) of 30 nm (●), 50 nm (■) and 90 nm (▲). Asterisks indicate significant difference from control  $^{***}p \leq 0.001$ ,  $^{**}p \leq 0.01$  and  $^{*}p \leq 0.05$ ...146

**Figure 5** Effects of AgNPs of 4.7 and 42 nm (A) and AuNPs of 30, 50 and 90 nm (B) in the total glutathione content on HPF cells. Cells were cultured with 24 h MTT EC<sub>50</sub> doses of Ag-AuNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (■) h. Control untreated cells. Asterisks indicate significant difference from control  $^{***}p \leq 0.001$ ,  $^{**}p \leq 0.01$  and  $^{*}p \leq 0.05$  .....147

|                 |   |     |
|-----------------|---|-----|
| <b>Figure 6</b> | <i>Effects of AgNPs 4.7 and 42 nm (A) and AuNPs 30, 50 and 90 nm (B) in the SOD activity on HPF cells. Cells were cultured with 24 h MTT EC<sub>50</sub> doses of Ag-AuNPs for 24 (■), 48 (□) and 72 (■) h.....</i> | 147 |
|-----------------|---|-----|

## Artículo V

|                 |   |     |
|-----------------|---|-----|
| <b>Figure 1</b> | <i>DNA strand breaks in HepG2 (A), HL-60 (B), NHDF (C) and HPF (D) cells exposed to AgNPs of 4.7 nm, as determined by comet assay. The results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments for data point of the % DNA in the tail of cells. C<sub>0</sub> – untreated cells without enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control *** P ≤ 0.001, * P ≤ 0.05.....</i> | 156 |
|-----------------|---|-----|

|                 |  |     |
|-----------------|--|-----|
| <b>Figure 2</b> | <i>DNA strand breaks in HepG2 (A), HL-60 (B), NHDF (C) and HPF (D) cells exposed to AgNPs of 42 nm, as determined by comet assay. The results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments for data point of the % DNA in the tail of cells. C<sub>0</sub> – untreated cells without enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control *** P ≤ 0.001, ** P ≤ 0.01, * P ≤ 0.05 .....</i> | 157 |
|-----------------|--|-----|

|                 |   |     |
|-----------------|---|-----|
| <b>Figure 3</b> | <i>Oxidative DNA damage, Endo III-sites (□) and Fpg-sites (■) in HepG2 cells exposed to AgNPs of 4.7 nm (A) and 42 nm (B), using the enzyme-modified comet assay. C<sub>0</sub> - untreated cells incubated with Endo III (□) and Fpg (■) enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control *** P ≤ 0.001, ** P ≤ 0.01.....</i> | 157 |
|-----------------|---|-----|

|                 |   |     |
|-----------------|---|-----|
| <b>Figure 4</b> | <i>Oxidative DNA damage, Endo III-sites (□) and Fpg-sites (■) in HL-60 cells exposed to AgNPs of 4.7 nm (A) and 42 nm (B), using the enzyme-modified comet assay. C<sub>0</sub> - untreated cells incubated with Endo III (□) and Fpg (■) enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control *** P ≤ 0.001, ** P ≤ 0.01.....</i> | 158 |
|-----------------|---|-----|

|                 |  |     |
|-----------------|--|-----|
| <b>Figure 5</b> | <i>Oxidative DNA damage, Endo III-sites (□) and Fpg-sites (■) in NHDF cells exposed to AgNPs of 4.7 nm (A) and 42 nm (B), using the enzyme-modified comet assay. C<sub>0</sub> - untreated cells incubated with Endo III (□) and Fpg (■) enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control *** P ≤ 0.001, ** P ≤ 0.01.....</i> | 158 |
|-----------------|--|-----|

**Figure 6** Oxidative DNA damage, Endo III-sites (□) and Fpg-sites (■) in HPF cells exposed to AgNPs of 4.7 nm (A) and 42 nm (B), using the enzyme-modified comet assay. C<sub>0</sub> - untreated cells incubated with Endo III (□) and Fpg (■) enzymes. Asterisks indicate significant difference from the control \*\*\*  $P \leq 0.001$ .....158

## Artículo VI

**Figure 1** *Drosophila* treated with AgNPs exhibit defects in cuticle development and melanization. *Drosophila* exposed to 25 mg/ml and 250 mg/ml (AgNPs 4.7 and 42 nm, respectively) via ingestion have unpigmented cuticle as compared to normal control *Drosophila* .....168

## Artículo VII

**Figure 1** Morphological changes of nuclear chromatin in HepG2 (A and D) and HL-60 (B and C) cells treated with AgNPs and AuNPs. Cells were plated in the absence (A) or the presence of 3.36 µg mL<sup>-1</sup> of 4.7 nm AgNPs (B), 200 µg mL<sup>-1</sup> of 42 nm AgNPs (C) and 15 µg mL<sup>-1</sup> of 30 nm AuNPs (D) for 24 hours.....176

**Figure 2** Flow cytometric analysis using annexin V/PI assay of HL-60 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 17 (▨), 24 (■) and 48 (■) h. C<sub>0</sub> untreated cells with a percentage of apoptosis after 17, 24 and 48 h of 7.3%, 10% and 15.2%, respectively. C<sub>1</sub>, cells exposed with etoposide (5 µM) with a percentage of apoptotic cells of 27.1%, 42.7% and 54.4% after 17, 24 and 48 h, respectively. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*  $p \leq 0.05$  .....176

**Figure 3** Flow cytometric analysis using TUNEL assay of HepG2 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 48 (■) and 72 (■) h. C<sub>0</sub> untreated cells with a percentage of apoptosis after 48 and 72 h of 18.7% and 21.1%, respectively. C<sub>1</sub>, cells exposed with etoposide (100 µM) with a percentage of apoptotic cells of 42.7% and 62.6% after 48 and 72 h, respectively. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$  .....177



- Figure 4** Flow cytometric analysis using TUNEL assay of HL-60 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 48 (■) and 72 (▒) h. C<sub>0</sub> untreated cells with a percentage of apoptosis after 48 and 72 h of 13.5% and 17.7%, respectively. C<sub>1</sub>, cells exposed with etoposide (5 μM) with a percentage of apoptotic cells of 39.3% and 52.1% after 48 and 72 h, respectively. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$  and \*  $p \leq 0.05$  .....178
- Figure 5** Flow cytometric analysis using caspase activation assay of HepG2 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 24 h. C<sub>0</sub> untreated cells with a 10% of apoptosis. C<sub>1</sub>, cells exposed with etoposide (100 μM) with a 38% of apoptosis. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ .....178
- Figure 6** Flow cytometric analysis using caspase activation assay of HL-60 cells exposed with different concentrations of 4.7 nm AgNPs (a), 42 nm AgNPs (b) and 30 nm AuNPs (c) for 24 h. C<sub>0</sub> untreated cells with a 12.6% of apoptosis. C<sub>1</sub>, cells exposed with etoposide (5 μM) with a 35.4% of apoptosis. Asterisks indicate significant difference from control \*\*\*  $p \leq 0.001$ .....179



